



**COMPORTAMIENTO DE LA MATERIA
ORGÁNICA Y PLAGUICIDAS EN UN SUELO
AGRÍCOLA SOMETIDO A SEQUÍA SEVERA.
EFECTOS EN LAS PROPIEDADES
QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS.**

Memoria que presenta **Luis Miguel Franco Andreu**
para optar al título de Doctor en Química.

Sevilla, Marzo 2017.

Fdo. Luis Miguel Franco Andreu



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE CRISTALOGRAFIA, MINERALOGIA Y QUIMICA
AGRICOLA

Dra. Rosario Vaz Pardal, directora del Departamento de Cristalografía, Mineralogía y
Química Agrícola,

CERTIFICA: Que el Ldo. D. Luis Miguel Franco Andreu ha realizado bajo la
dirección de los doctores D. Manuel Tejada Moral y D. Isidoro
Gómez Parrales el trabajo titulado “**COMPORTAMIENTO DE
LA MATERIA ORGÁNICA Y PLAGUICIDAS EN UN
SUELO AGRÍCOLA SOMETIDO A SEQUÍA SEVERA.
EFECTOS EN LAS PROPIEDADES QUÍMICAS Y
BIOLÓGICAS.**” Para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Sevilla, cumpliendo los requisitos de la
legislación vigente.

Firmado:

Dra. Rosario Vaz Pardal

Sevilla, Marzo 2017

**COMPORTAMIENTO DE LA MATERIA
ORGÁNICA Y PLAGUICIDAS EN UN SUELO
AGRÍCOLA SOMETIDO A SEQUÍA SEVERA.
EFECTOS EN LAS PROPIEDADES
QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS**

**Departamento de Cristalografía, Mineralogía y
Química Agrícola
Universidad de Sevilla**

Programa de doctorado:

RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

Línea de investigación:

EDAFOLOGIA AMBIENTAL

Visado en Sevilla, Marzo 2017

LOS DIRECTORES

Dr. Manuel Tejada Moral

Profesor Titular, Universidad de Sevilla

Dr. Isidoro Gómez Parrales

Profesor Contratado Doctor, Universidad de Sevilla

AGRADECIMIENTOS

(Porque es de bien nacidos ser agradecidos)

En estas líneas quiero expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a todas esas personas con las que he convivido estos tres años y que me han aguantado hasta la finalización de la presente tesis.

En primer lugar, y muy a mi pesar por el hecho de ser bético, a la Peña Sevillista de San José de la Rinconada, por darme trabajo, gracias al cual he podido realizar la presente tesis doctoral, en especial a Paqui y Antonio, por ser tan buenos compañeros.

A mis directores de tesis, Dr. Manuel Tejada Moral y Dr. Isidoro Gómez Parrales, por la orientación, paciencia, consejos y apoyo durante estos años.

A María José Martínez de Alba y a José Luis Lozano, por estar en las buenas y las malas, por animarme cuando lo necesitaba, por echarme una mano y por estar ahí conmigo desde el principio de la presente tesis doctoral.

A la profesora Dra. Patricia Paneque Macías, por dejarme dar mis primeros pasos en la investigación y por convertirse con el paso de los años en una muy buena amiga. Gracias, Patri.

A las profesoras de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Dra. María Luz Mato Iglesias y Dra. Marina del Toro Carrillo de Albornoz, por su apoyo durante estos tres años y por los ratos en la máquina de café, que hicieron más llevadera esta etapa.

Al catedrático Juan Parrado Rubio, por sus valiosos consejos y por atenderme siempre que necesitaba ayuda.

A la gente del laboratorio del departamento de *Bioquímica y biología molecular* de la facultad de Farmacia, en especial a Bruno, por dejarme hacer uso del laboratorio, instruirme en aquello que no sabía... y por invitarme a cervezas siempre que se podía.

A la profesora de investigación Dra. Heike Kniker, por prestarme su ayuda en la resolución de los espectros de RMN.

A todos los alumnos de trabajo de fin de grado que han pasado por el laboratorio: Marisa, Luis y Adrián, en especial, a pesar de que no comenzamos con buen pie, a María Martín García, por su apoyo, por aguantarnos mutuamente, por nuestras tonterías, y por hacer que el laboratorio fuera un sitio menos aburrido.

A mi familia, muy en especial a mis padres, mi hermano y mi cuñada, por estar a mi lado siempre, por su cariño y apoyo incondicional; pero sobre todo por haber sufrido con paciencia la realización de esta tesis.

A mi otra “*familia*”, esas personas que han estado ahí, incluso desde mucho antes de la realización de la presente tesis: Ángel Luis Navarro, Cristina Lamilla, Amanda Martín, Enrique Marrón, Juan Pablo García, Paloma Ávila, Alejandro Moya y Carlos Sales, en especial, a Javier Castro Pozuelos y Luis Alberto Díaz Castro, quienes han estado conmigo desde el principio de la carrera y a los cuales los considero como si fueran mis hermanos.

INDICE

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
 1. INTRODUCCIÓN.....	 1
1.1. EFECTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO EN LA AGRICULTURA.....	4
1.2. ÍNDICES DE CALIDAD DEL SUELO.....	9
1.2.1. Indicadores químicos.....	11
1.2.2. Indicadores biológicos.....	13
1.2.2.1. Actividades enzimáticas como indicadores de la calidad del suelo.....	14
1.2.2.2. Biodiversidad microbiana como indicador de la calidad del suelo.....	16
 2. OBJETIVOS.....	 21
 3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	 25
3.1. CARACTERÍSTICAS DEL SUELO, RESIDUOS ORGÁNICOS Y PLAGUICIDAS UTILIZADOS.....	28
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	31
3.2.1. Primera experiencia de incubación.....	31
3.2.2. Segunda experiencia de incubación.....	33
3.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	36
3.3.1. Determinación de parámetros físicos.....	36

3.3.1.1. Determinación de la textura.....	36
3.3.2. Determinación de parámetros químicos.....	37
3.3.2.1. Determinación del pH.....	37
3.3.2.2. Determinación de N-Kjeldahl.....	37
3.3.2.3. Determinación del C-orgánico total.....	38
3.3.2.4. Determinación del C de ácidos húmicos y ácidos fúlvicos.....	39
3.3.2.5. Estudio de los grupos funcionales de los ácidos húmicos.....	40
3.3.2.6. Carbono soluble en agua.....	41
3.3.2.7. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹³ C de estado sólido.....	41
3.3.2.8. Determinación de la distribución del peso molecular de las proteínas.....	43
3.3.2.9. Determinación de P asimilable.....	43
3.3.2.10. Determinación de K asimilable.....	44
3.3.2.11. Determinación de metales pesados totales.....	44
3.3.3. Determinación de parámetros biológicos.....	45
3.3.3.1. Carbono de biomasa microbiana.....	45
3.3.3.2. Actividad deshidrogenasa.....	46
3.3.3.3. Actividad ureasa.....	47
3.3.3.4. Actividad β-glucosidasa.....	48
3.3.3.5. Actividad fosfatasa alcalina.....	50
3.3.3.6. Actividad o-difenol oxidasa.....	51
3.3.3.7. Perfil de ácidos grasos de fosfolípidos de membrana (PLFAs).....	52
3.3.4. Determinación de plaguicidas en suelo.....	54

3.3.4.1. Determinación de oxifluorfen en suelo.....	54
3.3.4.2. Determinación de clorpirifos en suelo.....	55
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	55
4. RESULTADOS.....	57
4.1. PRIMERA EXPERIENCIA DE INCUBACIÓN.....	59
4.1.1. Humedad del suelo.....	59
4.1.2. Propiedades químicas del suelo.....	59
4.1.3. Propiedades bioquímicas del suelo.....	65
4.1.4. Biodiversidad microbiana del suelo.....	69
4.2. SEGUNDA EXPERIENCIA DE INCUBACIÓN.....	71
4.2.1. Humedad del suelo.....	71
4.2.2. Propiedades bioquímicas del suelo.....	72
4.2.3. Biodiversidad microbiana del suelo.....	79
4.2.4. Evolución de los plaguicidas en suelo.....	82
5. DISCUSIÓN.....	85
5.1. PRIMERA EXPERIENCIA DE INCUBACIÓN.....	87
5.1.1. Suelos regados.....	87
5.1.2. Suelos no regados.....	89
5.2. SEGUNDA EXPERIENCIA DE INCUBACIÓN.....	92
5.2.1. Suelos regados.....	92
5.2.2. Suelos no regados.....	93
6. CONCLUSIONES.....	95
7. BIBLIOGRAFÍA.....	99

8. PUBLICACIONES OBTENIDAS.....	117
--	------------

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Introducción

Tabla 1. Indicadores físicos, químicos y biológicos de la calidad del suelo.....	11
Tabla 2. Funciones de algunas actividades enzimáticas del suelo.....	15
Tabla 3. Resumen de los patrones más importantes de fosfolípidos que pueden ser utilizados para determinar la composición comunitaria de la microbiota del suelo (Zelles, 1999).....	19

Material y métodos

Tabla 4. Características del suelo, residuos orgánicos experimentales y grupos funcionales ácidos de los ácidos húmicos aislados de los residuos orgánicos (media \pm error estándar, $n = 3$).....	29
Tabla 5. Nomenclatura de las muestras en la primera experiencia de incubación y el tratamiento al que corresponde.....	32
Tabla 6. Nomenclatura de las muestras en la segunda experiencia de incubación y el tratamiento al que corresponde.....	35
Tabla 7. Asignación típica de los picos de RMN de ^{13}C en estado sólido a grupos funcionales presentes en muestras geoquímicas. (Referencia tetrametilsilano=0 ppm).....	43

Resultados

Tabla 8. Evolución del Carbono soluble en agua ($\mu\text{g C g}^{-1}$) (media \pm error estándar, $n=3$) en suelos regados y no regados durante el periodo experimental. Los números en la fila seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($p>0,05$).....	60
Tabla 9. Evolución de la distribución del peso molecular de la proteína (kDa) (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados durante el periodo experimental. Los números en la fila seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($p>0,05$).....	61

Tabla 10. Evolución del Carbono de ácidos fúlvicos y ácidos húmicos (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados durante el periodo experimental. Los números en la fila seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).....	62
Tabla 11. Evolución de los picos de RMN de ^{13}C en estado sólido y relación C alquilo/C O-alquilo (A/O-A) en los tratamientos fertilizantes a los 30 y 365 días de iniciado el experimento.....	64
Tabla 12. Evolución de bacterias Gram ⁺ , Gram ⁻ , bacterias totales PLFAs y hongos PLFAs (ng g ⁻¹) (media \pm error estándar, $n = 3$) en los tratamientos fertilizantes a los 30 y 365 días de iniciado el experimento Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).....	70
Tabla 13. Evolución de la actividad deshidrogenasa ($\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados en presencia de oxifluorfen y clorpirifos durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$). INTF: 2- <i>p</i> -iodo-3-nitrophenyl formazan.....	73
Tabla 14. Evolución de la actividad ureasa ($\mu\text{g NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados en presencia de oxifluorfen y clorpirifos durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).....	76
Tabla 15. Evolución de la actividad β -glucosidasa (mmol PNP g ⁻¹ h ⁻¹)(media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados en presencia de oxifluorfen y clorpirifos durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).PNP: <i>p</i> -nitrofenol.....	77
Tabla 16. Evolución de la actividad fosfatasa ($\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados en presencia de oxifluorfen y clorpirifos durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$). PNP: <i>p</i> -nitrofenol.....	78
Tabla 17. Evolución de bacterias Gram ⁺ , Gram ⁻ , bacterias totales PLFAs y hongos PLFAs (ng g ⁻¹) (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados con oxifluorfen durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).....	80
Tabla 18. Evolución de bacterias Gram ⁺ , Gram ⁻ , bacterias totales PLFAs y hongos PLFAs (ng g ⁻¹) (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados con	

clorpirifos durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p>0,05$).....81

Tabla 19. Evolución de oxifluorfen y clorpirifos (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados con clorpirifos durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p>0,05$).....83

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Introducción

Figura 1. Evolución de la temperatura (°C) global media durante el siglo XX y parte del siglo XXI. Datos proporcionados por GISTEMP Team (2016).....	4
Figura 2. Áreas afectadas por el efecto de recientes eventos de sequía (2000, 2003 y 2006).....	5
Figura 3. Consecuencias en suelo y cultivos de la pérdida de agua en suelo.....	8
Figura 4. Procesos biológicos del suelo catalizados por enzimas.....	14
Figura 5. Detalle de la membrana celular de una bacteria.....	18

Materiales y métodos

Figura 6. Estructura del oxifluorfen ($C_{15}H_{11}ClF_3NO_4$).....	30
Figura 7. Estructura del clorpirifos ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$).....	31
Figura 8. Reacción del 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT) transformándose a iodonitrotetrazolio formazan (INTF).....	46
Figura 9. Esquema de la reacción generalizada de la o-difenol oxidasa.....	51

Resultados

Figura 10. Evolución de la humedad (%) (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos no regados durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).....	59
Figura 11. Evolución del C de la biomasa microbiana (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).....	65
Figura 12. Evolución de la actividad deshidrogenasa (media \pm error estándar, $n = 3$) en no regados durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no	

presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).INTF: 2- <i>p</i> -iodo-3-nitrophenyl formazan.....	66
Figura 13. Evolución de la actividad ureasa (media \pm error estándar, $n = 3$) en no regados durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).....	67
Figura 14. Evolución de la actividad β -glucosidasa (media \pm error estándar, $n = 3$) en no regados durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).PNP: <i>p</i> -nitrofenol.....	68
Figura 15. Evolución de la actividad fosfatasa (media \pm error estándar, $n = 3$) en no regados durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).PNP: <i>p</i> -nitrofenol.....	69
Figura 16. Evolución de la actividad <i>o</i> -difenoloxidasa (media \pm error estándar, $n = 3$) en no regados durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).....	69
Figura 17. Evolución de la humedad (%) (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos no regados y con oxifluorfen (A) y clorpirifos (B) durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).....	72

1. INTRODUCCION

En la actualidad, diversos estudios científicos, así como las evaluaciones del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC), han demostrado que, debido al aumento en el consumo de combustibles fósiles y la deforestación, las concentraciones atmosféricas de dióxido de carbono (CO_2) y otros gases de efecto invernadero (principalmente N_2O y CH_4) están aumentando de forma progresiva, provocando que el clima de la Tierra esté cambiando sustancialmente (Houghton et al., 2001; IPCC, 2013).

La historia nos ha enseñado, que los cambios climáticos de la tierra han sido procesos naturales que se han producido muy lentamente. Sin embargo, en el siglo XVIII la historia comienza a cambiar. La población había aumentado tanto que ya ocupaba casi todos los lugares del planeta y necesitaba cada vez más alimentos, ropa, muebles, casas, etc. Se mantenían grandes cantidades de cabezas de ganado y se cultivaban grandes extensiones de tierra. Debido a la necesidad de obtener recursos para la población mundial, se produce una transformación social y económica, iniciada en Reino Unido; llamada la “Revolución Industrial”. Con la Revolución Industrial, el número de fábricas comenzó a aumentar alrededor del mundo, aumentando de esta forma la producción de recursos y facilitando nuevos puestos de trabajo.

Debido a toda la innovación económica y tecnológica producida durante esta Revolución Industrial, comenzó la utilización de combustibles fósiles para la obtención de energía para el funcionamiento de la maquinaria industrial. Todos estos avances produjeron grandes beneficios, tanto a nivel social como a nivel económico. Sin embargo, la quema continua y excesiva de estos combustibles fósiles produjo grandes cantidades de gases que se emitían a la atmósfera. Las grandes plantaciones, el mantenimiento de animales y la tala de bosques también producen grandes cantidades de estos gases de efecto invernadero.

Desde la revolución industrial ha habido un drástico aumento de la concentración atmosférica de dióxido de carbono (CO_2) y otros gases de efecto invernadero (Lal, 2004). La concentración atmosférica de CO_2 ha aumentado de 280 ppm en 1750 a 367 ppm en 1999 y actualmente está aumentando a razón de 1,5 ppm/año o 3,3 Pg C/año (Lal, 2004). La concentración de metano atmosférico (CH_4) ha aumentado de 700 a 1745 ppb aproximadamente en el mismo período y está aumentando a una tasa de 7 ppb/año. Del mismo modo, la concentración atmosférica de óxido nitroso (N_2O) ha aumentado de 270 ppb en 1750 a 314 ppb y aumentando de forma progresiva a la tasa de 0,8 ppb/año (Lal,

2004). Este enriquecimiento antropogénico de los gases de efecto invernadero en la atmósfera provocó un aumento en la temperatura media global de $0,6 \pm 0,2$ °C durante el siglo XX (Figura 1) (Nadal et al., 2015). Además, se prevé que la temperatura del aire aumentará de 1,8 a 4,0 °C a finales del siglo XXI, bajo una serie de escenarios probables de emisiones de gases de efecto invernadero, siendo las latitudes altas las más gravemente afectadas (Noyes et al., 2009). Aún más, existen autores que indican que si en este mismo instante se detuviesen las emisiones de gases de efecto invernadero los impactos negativos causados por las emisiones pasadas seguirían su curso (Collet et al., 2015).

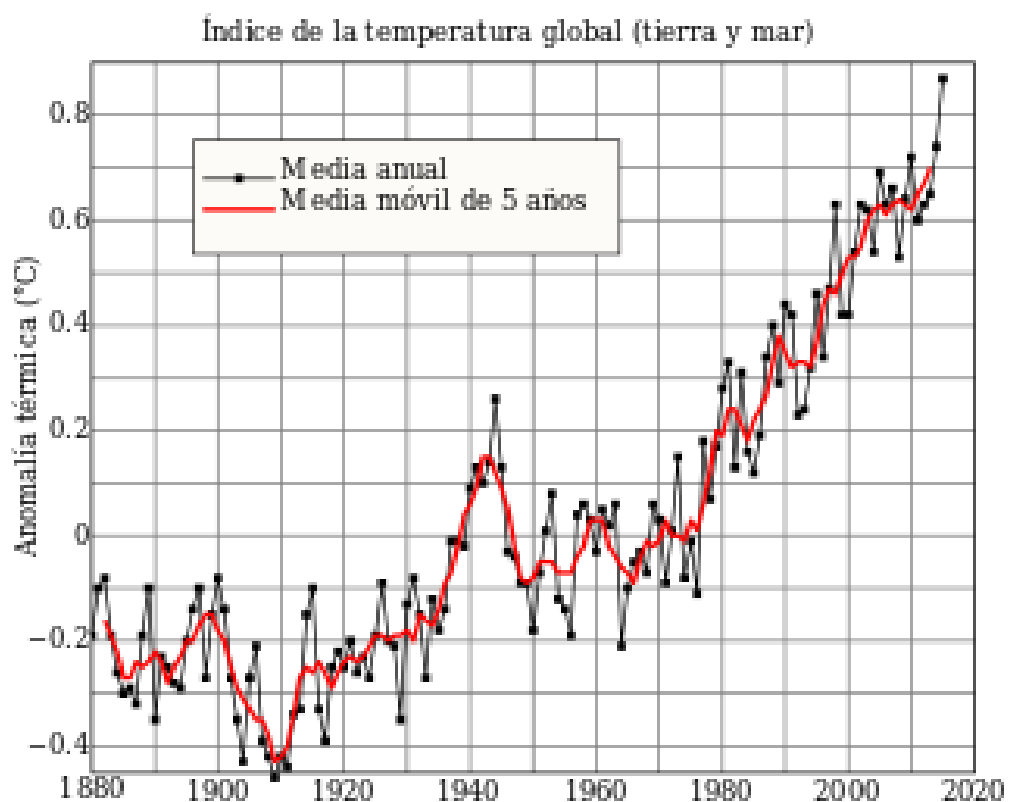


Figura 1. Evolución de la temperatura (°C) global media durante el siglo XX y parte del siglo XXI. Datos proporcionados por GISTEMP Team (2016).

La región mediterránea se encuentra en una zona de transición entre el clima árido del norte de África y el clima templado y lluvioso de Europa central, y se ve afectada por las interacciones entre la latitud media y los procesos tropicales (Giorgi y Lionello, 2008). El clima del Mediterráneo es suave y húmedo durante el invierno y caliente y seco durante el verano. El clima invernal está dominado principalmente por el movimiento hacia el oeste de las tormentas que se originan sobre el Atlántico y que inciden en las costas de

1. Introducción

Europa occidental. El clima mediterráneo invernal y, lo que es más importante, la precipitación, se ve afectado por la Oscilación del Atlántico Norte (NAO) sobre sus áreas occidentales (Hurrell, 1995), el Atlántico Este (EA) y otros patrones en sus áreas norte y este (Trigo et al., 2006). También se ha sugerido, que la Oscilación del Sur El Niño (ENSO) influye significativamente en la variabilidad de las precipitaciones invernales en el Mediterráneo Oriental (junto con la precipitación de primavera y otoño sobre la península Ibérica y el noroeste de África) (Alpert et al., 2006). Además de las tormentas atlánticas, las tormentas mediterráneas también pueden ser producidas internamente en la región en correspondencia con las áreas ciclogénicas como el lee de los Alpes, el Golfo de Lyon y el Golfo de Génova (Lionello et al., 2006).

Debido a todas estas características, el área del Mediterráneo está considerada como una región potencialmente vulnerable y muy sensible a los cambios climáticos inducidos (Lionello et al., 2006; Ulbrich et al., 2006; Nadal et al., 2015). De hecho, la región mediterránea ha mostrado grandes cambios climáticos en el pasado (Luterbacher et al., 2006) y se ha identificado como uno de los puntos calientes más prominentes en las proyecciones futuras del cambio climático (Giorgi, 2006) (Figura 2).

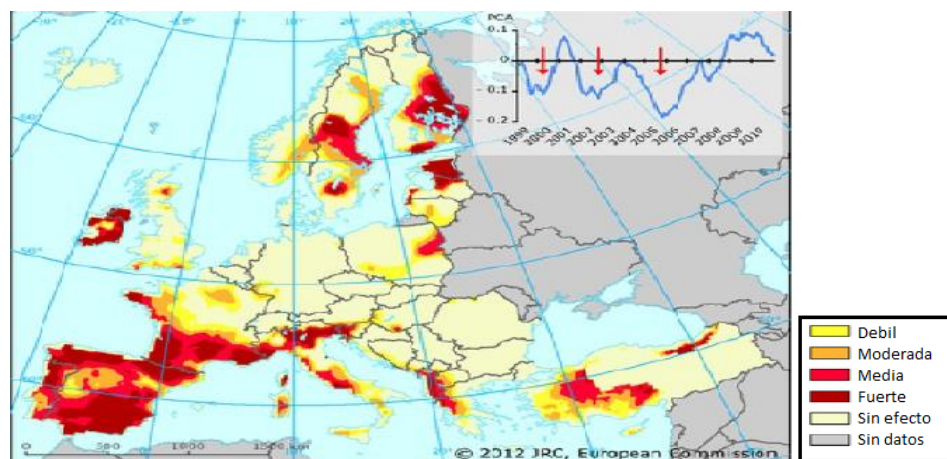


Figura 2. Áreas afectadas por el efecto de recientes eventos de sequía (2000, 2003 y 2006).

Como consecuencia de tal cambio climático, las simulaciones realizadas por los Modelos de Circulación General predicen que, en el área mediterránea, se espera un aumento de la frecuencia e intensidad de las sequías y las olas de calor, lo que constituye

una grave amenaza para el desarrollo y funcionamiento de los agroecosistemas, así como de la calidad del suelo (Bérard et al., 2011; Hueso et al., 2011; Sánchez-Canales et al., 2012; Acosta-Martínez et al., 2014; Lespinas et al., 2014). De hecho, en la mayoría de las regiones del oeste y centro del Mediterráneo se ha observado una tendencia hacia condiciones más secas y una mayor sequía después de los años setenta (Hoerling et al., 2012; Tramblay et al., 2013; Spinoni et al., 2015). Todo esto hace pensar que las sequías futuras pueden ser más severas. Por lo tanto, es necesario cuantificar mejor esta amenaza a los recursos hídricos con métodos adaptados a las condiciones climáticas específicas del Mediterráneo (Hertig y Tramblay, 2016).

1.1. EFECTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO EN LA AGRICULTURA

Debido a los efectos ocasionados por el cambio climático, se prevé un importante cambio en la agricultura, y en concreto, en la productividad de los cultivos en Europa.

Se espera que el cambio climático afecte a la agricultura de manera muy diferente en diferentes partes del mundo (Olesen y Bindi, 2002). Los efectos resultantes de dicho cambio climático dependerán de las condiciones climáticas y del suelo actuales, de la dirección del cambio y de la disponibilidad de recursos e infraestructura para hacer frente a dicho cambio (Olesen y Bindi, 2002).

Respecto al continente europeo, se espera que ocurra un gran cambio en la agricultura, debido a las variaciones climáticas que están sucediendo. Se prevé una ampliación de las diferencias de recursos hídricos entre el Norte y el Sur de Europa (IPCC, 2007): las regiones del Mediterráneo Central y Oriental podrían experimentar las mayores disminuciones y el norte de Europa los mayores aumentos del suministro de agua debido al aumento de las precipitaciones.

Como consecuencia de todo esto, en el norte de Europa, es probable que la adecuación y la productividad de los cultivos aumenten y se extiendan hacia el norte, especialmente para los cereales y los cultivos de semillas de la estación fría (Maracchi et al., 2005, Tuck et al., 2006; Olesen et al. 2007). Los cultivos predominantes en la actualidad en el sur de Europa, como el maíz, el girasol y la soja, también podrían volverse más viables hacia el norte y a altitudes más elevadas (Hilden et al., 2005, Audsley et al., 2006; Olesen et al., 2007). En este caso, los rendimientos podrían aumentar hasta en un 30% en la década de 2050, dependiendo del cultivo (Ewert et al., 2005; Audsley et al.,

2006; Olesen et al., 2007). En Europa central y oriental, el cambio climático y los avances tecnológicos probablemente harán que aumente la productividad de los cultivos, lo que dará lugar a la sustitución de los cultivos forrajeros por cultivos comerciales (Henseler et al., 2008). Por el contrario, es probable que la productividad y la idoneidad de los cultivos disminuyan cuando la precipitación disminuye significativamente, como en el Mediterráneo, el Sur y el Sudeste de Europa (Olesen y Bindi, 2002; Maracchi et al., 2005), en particular para la energía, el almidón, los cereales y el biocombustible sólido (Tuck et al., 2006).

Estos cambios tan drásticos y dramáticos que se prevén en el área mediterránea son de gran preocupación y, probablemente, sean consecuencia de que en los suelos agrícolas mediterráneos, la disponibilidad del agua es un factor clave y crítico para el funcionamiento de dicho ecosistema. Sardans et al. (2008), Hueso et al. (2012a,b) y Curiel Yuste et al. (2014) sugieren que la disponibilidad de agua es el factor crítico principal de la producción agrícola en las regiones áridas y semiáridas, y en consecuencia, es un elemento fundamental para el desarrollo y mantenimiento de los ecosistemas mediterráneos. Se prevé que en estos ecosistemas, el proceso de evapotranspiración del agua sea mayor que el proceso de recarga de humedad del suelo por el efecto de la lluvia, lo cual traerá repercusiones negativas en el desarrollo de dichos ecosistemas así como en el desarrollo y producción de los cultivos, sobre todo si son de secano (Seneviratne et al., 2010; Valverde et al., 2015). De esta forma, la escasez de agua en el suelo repercutirá no solo en la evolución del mismo, sino también en el desarrollo de los cultivos (Figura 3).

Esta disminución de la producción, inducida por la sequía, unida al aumento de la demanda de alimentos que actualmente se está produciendo debido al aumento de la población a nivel mundial, probablemente genere condiciones adversas al desarrollo de dicha población por la falta de alimentos (Nouri et al., 2016).



Figura 3. Consecuencias en suelo y cultivos de la pérdida de agua en suelo.

Por otro lado, la actividad biológica del suelo es muy sensible a los cambios de humedad que se producen, y se ven afectados por los episodios de sequía producidos por los efectos del calentamiento global (Sowerby et al., 2005; Hueso et al., 2012b). Esto tiene graves repercusiones sobre los ecosistemas, ya que cada vez hay más evidencia de que la actividad microbiana tiene una influencia directa sobre la estabilidad y la fertilidad de los mismos, (Hu et al., 2011, Gabriel y Kellman, 2014). La disponibilidad de agua es conocida por afectar el estado osmótico de las células microbianas e indirectamente afecta a la disponibilidad de sustrato, la difusión de los gases, el pH del suelo y la temperatura (Schimel et al., 2007; Hueso et al., 2012a). Esto alterará negativamente al crecimiento y funcionamiento de los ecosistemas, haciendo disminuir no solo la subsistencia de los distintos microorganismos en el suelo (Luo y Zhou, 2006; Chen et al., 2007; Manzoni et al., 2012), sino también disminuir los procesos de degradación de los distintos sustratos orgánicos existentes (Chen et al., 2007), lo cual desemboca en una disminución en el desarrollo y crecimiento de las especies vegetales presentes en dichos suelos (Valverde et al., 2015).

Como consecuencia de esto, en los últimos años, diversos autores han puesto de manifiesto la necesidad de establecer diversas estrategias agrícolas que puedan aumentar la disponibilidad del agua en el suelo (Pereira et al., 2012; Saadi et al., 2015). En los suelos agrícolas mediterráneos, es muy habitual el uso de materia orgánica con el objeto de mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas de dichos suelos así como el de mejorar la producción y calidad de las cosechas obtenidas (Tejada et al., 2008a; Tejada y González, 2009; Tejada y Benítez, 2011; Hueso et al., 2012b). Desde hace mucho tiempo, es bien conocido que la materia orgánica puede retener agua y en consecuencia mejorar la humedad del suelo. Por tanto, la aplicación de materia orgánica con este fin podría ser una buena estrategia para mitigar los efectos negativos en el suelo debido al cambio

climático. Esto es un aspecto de gran interés sobre el que investigar, ya que en la actualidad, no existen trabajos que estudien cómo distintas fuentes de materia orgánica, con distinta composición química, pueden adsorber agua del suelo, mejorando el resto de propiedades químicas y biológicas.

Además, y como una estrategia de mitigación de la emisión de gases de efecto invernadero hacia la atmósfera, en los últimos años se está proponiendo el uso y aplicación de enmiendas orgánicas a los suelos, no solo con el objeto de mejorar las propiedades anteriormente citadas, sino también de aumentar la retención del C del suelo y así disminuir la cantidad de CO₂ emitido a la atmósfera (Lal, 2004; Alluvione et al., 2010; Tuomisto et al., 2012; Aguilera et al., 2013; Li et al., 2013).

Al igual que la aplicación de materia orgánica, en la agricultura convencional que se viene desarrollando en suelos agrícolas mediterráneos, también es muy común la utilización de distintos tipos de plaguicidas con objeto de disminuir posibles pérdidas económicas que puedan causar distintas plagas o malas hierbas (Gómez et al., 2014; Tejada et al., 2017). Hasta el momento, no se conoce como será el comportamiento en suelos sometidos a sequía severa debido al cambio climático, donde la humedad del suelo es un factor limitante. Por ello, al igual que la aplicación de distintos tipos de enmiendas orgánicas, su estudio sería de gran interés.

1.2. ÍNDICES DE CALIDAD DEL SUELO

El término “calidad del suelo” se comenzó a usar al reconocer las funciones de este (Karlen et al., 1997), las cuales son:

- Promover la productividad del sistema sin perder sus propiedades físicas, químicas y biológicas (productividad biológica sostenible).
- Atenuar los contaminantes ambientales y los patógenos (calidad ambiental).
- Favorecer la salud de las plantas, los animales y los humanos.

La calidad del suelo se considera, por tanto, como una medida de su capacidad para funcionar adecuadamente en relación con un uso específico (Gregorich et al., 1994). Sin embargo, Arshad y Coen (1992) le adjudicaron a este concepto un vínculo más

ecológico, al definirlo como su capacidad para aceptar, almacenar y reciclar agua, minerales y energía para la producción de cultivos, y a la vez preservar un ambiente sano.

Para que este concepto pueda ser funcional es necesario contar con variables que puedan servir para evaluar la condición del suelo. Así surgen los indicadores de calidad del suelo.

Los indicadores de la calidad de suelo se conciben como una herramienta de medición que debe ofrecer información sobre las propiedades, los procesos y las características. Estos se miden para evaluar los efectos del manejo del suelo en un periodo dado (Astier-Calderón et al., 2002).

Uno de los aspectos fundamentales que se pretende abordar en la presente tesis, es el establecimiento de índices de calidad del suelo que permitan conocer el comportamiento del suelo al someterlo a un estado de sequía severo y prolongado durante un largo periodo de tiempo. Estos indicadores deben cumplir las siguientes condiciones:

- Deben ser sensibles a los cambios que sufre el suelo
- Debe haber una alta correlación con los procesos del ecosistema.
- Deben integrar los procesos físicos, químicos y biológicos del suelo.
- Deben ser relativamente fáciles de medir, basados en información objetiva y fácil de reconocer.
- Permitir cambios y diferencias entre los sistemas.
- Centrarse en aspectos prácticos y claros.
- Reflejar el atributo de sostenibilidad que se quiere evaluar.
- Ser fáciles de entender.

La Tabla 1 muestra los distintos tipos de indicadores (físicos, químicos y biológicos) en el suelo así como su relación con las funciones y condiciones del suelo.

En el presente trabajo de tesis, se realizó el seguimiento del suelo por dos tipos de indicadores: químicos y biológicos.

Tabla 1. Indicadores físicos, químicos y biológicos de la calidad del suelo

Indicadores	Relación con las funciones y condiciones del suelo
1. FÍSICOS	
Textura del suelo	Retención y transporte de agua y minerales, erosión del suelo
Profundidad del suelo	Estimación del potencial productivo y de erosión
Infiltración y densidad aparente	Potencial de lavado; productividad y erosividad
Capacidad de retención de agua	Relación con la retención de agua, transporte, y erosividad; humedad aprovechable, textura y materia orgánica
Estabilidad de los agregados	Erosión potencial de un suelo. Infiltración de agua
2. QUÍMICOS	
Materia orgánica (C y N orgánico)	Define la fertilidad del suelo; estabilidad; erosión
pH	Define la actividad química y biológica, límites para el crecimiento de plantas y actividad biológica
Conductividad eléctrica	Define la actividad vegetal y microbiana, límites para el crecimiento de plantas y actividad biológica
N, P y K extraíble	Nutrientes disponibles para la planta, pérdida potencial de N; productividad e indicadores de la calidad ambiental
Capacidad de intercambio catiónico	Fertilidad del suelo, potencial productivo
Metales pesados disponibles	Niveles de toxicidad para el crecimiento de la planta y la calidad del cultivo
3. BIOLÓGICOS	
Biomasa microbiana (C y N)	Potencial catalizador microbiano y reposición de C y N
N potencial mineralizable	Productividad del suelo y aporte potencial de N
Respiración edáfica	Medición de la actividad microbiana
Número de lombrices	Relacionado con la actividad microbiana
Rendimiento del cultivo	Producción potencial del cultivo

1.2.1. Indicadores químicos

Dentro del grupo de parámetros que conforman los indicadores químicos (Tabla 1), la materia orgánica del suelo está considerada como el indicador más significativo de

calidad (Larson y Pierce, 1991). Doran y Parkin (1994) la denominaron como el componente más importante a seleccionar entre un grupo de datos mínimos y necesarios para definir la calidad del suelo. Sin embargo, esta materia orgánica varía poco a corto plazo con el manejo, por lo que se ha sugerido la utilización de diferentes fracciones o compartimientos funcionales como indicadores de la sostenibilidad de los sistemas agrícolas

Este trabajo de tesis se ha centrado en la evaluación de alguna de estas fracciones, como el carbono soluble en agua y el carbono de ácidos húmicos y fúlvicos, los cuales muestran variaciones en periodos cortos de tiempo.

Por otra parte, para profundizar en el conocimiento de la composición molecular de la materia orgánica, en este trabajo se han empleado técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN). Estas técnicas, son muy utilizadas por algunos autores (Bernset al., 2008; Knicker, 2011).

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una herramienta analítica que proporciona información sobre la estructura molecular en un tiempo asequible. La técnica no es destructiva. La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) estudia el comportamiento de los núcleos atómicos que poseen spin diferente de cero, bajo la influencia de un campo magnético externo. Los instrumentos RMN son cada día más potentes y se desarrollan frecuentemente actualizaciones y piezas complementarias para satisfacer las necesidades de los laboratorios de todas las áreas de la investigación científica. Si bien esta técnica no puede ser considerada como novedosa, lo es su aplicación en muestras de suelo sólidas.

Aunque sea posible seguir analizando muestras de suelo o de sus fracciones mediante RMN en estado líquido, la escasa solubilidad de esas muestras en los solventes comúnmente utilizados en RMN, convierte la RMN de estado sólido en la elección preferida de muchos investigadores de la ciencia del suelo. A diferencia del estado líquido, en estado sólido, la movilidad está muy restringida y se obtienen señales anchas, resultado de la suma de señales de todas las posibles orientaciones. Se han desarrollado técnicas que permitan obtener espectros de alta resolución en estado sólido: giro con ángulo mágico (MAS, Magic Angle Spinning), polarización cruzada (CP, Cross Polarization) (Simpson et al., 2011) o secuencias multipulso específicas para sólidos (CRAMPS, Combined Rotation and Multiple Pulse Spectroscopy). Un detector recoge

todas las señales emitidas y las transforma en espectros mediante la función de Transformada de Fourier (Panettieri, 2013).

1.2.2. Indicadores biológicos

La investigación y estudio de la biología del suelo se ha ido intensificando en los últimos años debido a la necesidad de conocer el rol que ejercen los distintos organismos del suelo sobre las diferentes reacciones químicas que ocurren en dicho suelo.

Los indicadores biológicos integran gran cantidad de factores que afectan la calidad del suelo como la abundancia y subproductos de micro y macroorganismos, incluidos bacterias, hongos, nematodos, lombrices y artrópodos. Incluyen funciones como la tasa de respiración, actividades enzimáticas, ergosterol y otros subproductos de los hongos, tasas de descomposición de los residuos vegetales, N y C de la biomasa microbiana (Karlen et al., 1997).

Una parte de esta memoria de tesis doctoral, ha sido el estudio de diversos parámetros bioquímicos, así como de la biodiversidad microbiana del suelo que, en los últimos años, está teniendo un gran peso específico sobre el estudio de la calidad del suelo. Esto se debe principalmente a que estos parámetros biológicos, a diferencia de los físicos y químicos, responden mucho más rápido a la aplicación de cualquier producto al suelo o cualquier manejo al que se esté sometiendo dicho suelo (Andreoni et al., 2004; Tejada et al., 2006; Zabaloy et al., 2008). El hecho de que estos cambios ocurran de forma mucho más rápida que los parámetros químicos y físicos, se debe principalmente a que los micro-organismos del suelo son muy sensibles a cualquier cambio, independientemente de si el cambio es positivo o negativo.

Sin embargo, hay que tener en consideración un aspecto de suma importancia. Aunque para su mejor comprensión se estudien independientemente unos indicadores de otros, entre todos ellos existe una estrecha interrelación y dependencia, que hace que de la interpretación de algunos pueda inferir el comportamiento de los otros (Mortola y Lupi, 2011).

1.2.2.1. Actividades enzimáticas como indicadores de la calidad del suelo

Los microorganismos del suelo, principalmente bacterias y hongos (Atlas y Bartha, 1998) determinan la calidad de un suelo a través de sus actividades metabólicas en muy diferentes condiciones medioambientales. Por este motivo, las actividades enzimáticas, además de ser utilizadas como medida de la actividad microbiana, han sido utilizadas como indicadores potenciales de la calidad del suelo, debido a su relación con la actividad biológica del mismo, facilidad de medida, y respuesta rápida a los cambios en el manejo del suelo (Dick et al., 1996; Benítez et al., 2006). Una enzima se define como una proteína producida por una célula viviente que funciona como catalizador de una reacción química específica. Las enzimas por su naturaleza proteica pueden ser afectadas por la temperatura y pH (Alexander, 1980) y durante las reacciones específicas en que ellas actúan, lo hacen como catalizadores orgánicos sin experimentar cambios en su estructura (Coyne, 2000). Un gran porcentaje de los procesos que tienen lugar en el suelo (Figura 4) son reacciones enzimáticas (mineralización, inmovilización, fijación de nitrógeno, etc.).

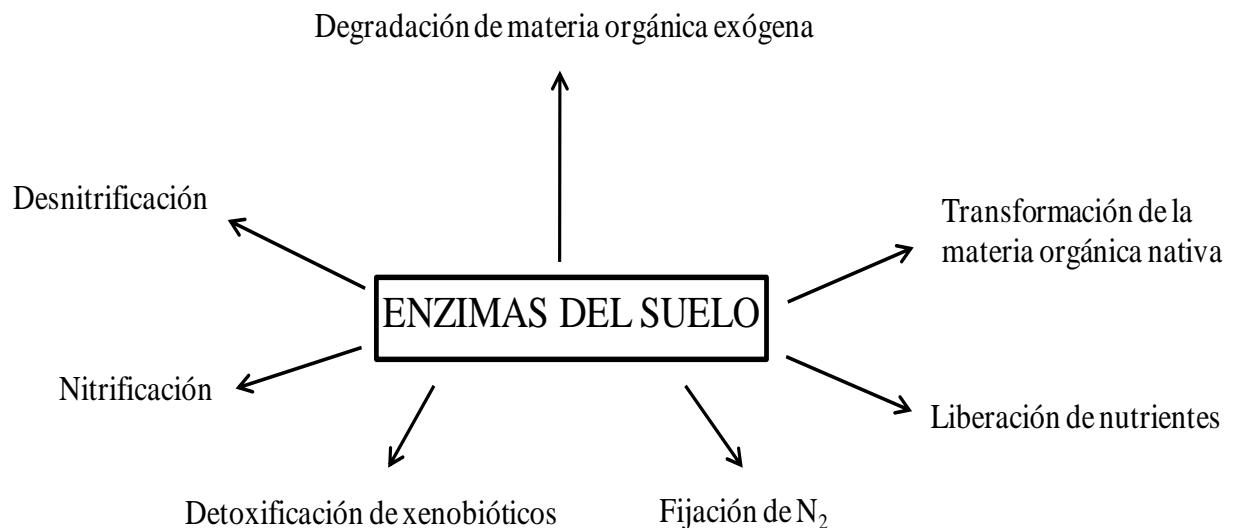


Figura 4. Procesos biológicos del suelo catalizados por enzimas

Las enzimas pueden existir en el suelo tanto en forma de proteínas libres (enzimas extracelulares o abióticas) o asociadas con organismos vivos (enzimas bióticas). Las primeras se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo y están protegidas por las sustancias húmicas, coloides y arcillas, lo que hace que su degradación y

desnaturalización (Ladd y Butler, 1975) se vea limitada y sus niveles de actividad sean constantes e independientes de la proliferación microbiana (Ceccanti et al., 1978).

Debido a que las enzimas son muy resistentes a los procesos de desnaturalización, su extracción del suelo es muy difícil y, por tanto, se estudian indirectamente midiendo su actividad, y expresándolas en cantidad de producto final por tiempo de incubación y cantidad de suelo.

Según su función, las enzimas del suelo más estudiadas son las oxidorreductasas (en particular, deshidrogenasas y catalasas) y las hidrolasas, que son enzimas relacionadas con el ciclo del C, N, P y S, dentro de las cuales, destacamos β -glucosidasas, proteasas, ureasa, fosfatasas, y arilsulfatasas. En consecuencia, existe una fuerte correlación entre la actividad bioquímica de los microorganismos de un suelo con la calidad de dicho suelo. En la Tabla 2 se muestran algunas de las actividades enzimáticas más estudiadas.

Tabla 2. Funciones de algunas actividades enzimáticas del suelo

Hidrolasas:

- **Invertasa:** Sacarosa \rightarrow glucosa + fructosa
- **Celulasa:** celulosa (cristalina) \rightarrow celulosa (amorfa) \rightarrow celobiosa
- **β -Glucosidasa:** celobiosa \rightarrow glucosa + ROH
- **Fosfomonoesterasa:** Fósforo orgánico \rightarrow Fósforo inorgánico
- **Ureasa:** Urea \rightarrow CO₂ + NH₄⁺
- **Proteasa:** Proteínas y péptidos \rightarrow NH₄
- **Arilsulfatasa:** Azufre orgánico \rightarrow Azufre inorgánico

Oxidoreductasas:

- **Deshidrogenasa:** XH₂ + A \rightarrow X + AH₂
 - **Fenol oxidasas:** monofenol + $\frac{1}{2}$ O₂ \rightarrow Quinona + H₂O
 - **Lacasa:** 4(difenol) + O₂ \rightarrow 4(quinona) + 2H₂O
 - **Peroxidasa:** donador e⁻ + H₂O₂ \rightarrow donador oxid. + H₂O
 - **Catalasa:** 2H₂O₂ \rightarrow 2H₂O + O₂
-

1.2.2.2. Biodiversidad microbiana como indicador de la calidad del suelo.

El término biodiversidad microbiana, describe el número de especies de microorganismos diferentes y su abundancia relativa en una comunidad determinada en un hábitat dado (Garbeva et al., 2004). Tradicionalmente, este número se ha estimado para el total de células procariotas sobre la tierra en $4-6 \times 10^{30}$, idea que comprende entre 10^6 y 10^8 genoespecies separadas (grupos taxonómicos distintos basados en el análisis secuencias de genes) (Cowan et al., 2005). Esto representa un enorme potencial biológico y genético que puede ser explotado para recuperar posibles nuevos genes, definir rutas metabólicas enteras y sus productos relacionados (Cowan et al., 2005). Se ha estimado que la diversidad microbiana del suelo está dentro de un rango de 3000 y 11000 genomas por gramo de suelo (Torsvik y Øvreås, 2002). Sin embargo, la inmensa diversidad genética y fenotípica de bacterias y hongos hacen de esta comunidad una de las más difíciles de estudiar (Øvreås y Torsvik, 1994).

Se ha sugerido que el 99% de las bacterias observadas bajo el microscopio no son cultivables por las técnicas comunes de laboratorio, por lo que se puede suponer que el 1% restante es representativo de toda la población y que ese 99% es simplemente un estado fisiológico que evita que sean cultivados en los medios actuales, o que es posible que el 99% sean fenotípicamente y genéticamente diferentes de ese 1% y solo la minoría de la población está representada (Michelle et al., 1999). Para vencer este obstáculo del estudio dependiente de cultivo, se han desarrollado varios métodos para identificar y estudiar esos microorganismos, como el análisis de ácidos grasos y métodos como las diferentes variaciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) para analizar ADN y ARN (Kirk et al., 2004).

Típicamente, las regiones de ADN que codifican para el 16S ARNr, 18S ARNr o ITS son blancos para la construcción de iniciadores para el estudio de la diversidad, ya que estos genes están presentes en todos los microorganismos y poseen regiones definidas para la clasificación taxonómica que no están sujetas a transferencia horizontal (Wintzingerode et al., 1997). Cabe destacar, que la utilización de iniciadores universales para la amplificación PCR de diversos genes 16S del total del ADN de la comunidad, ha generado una vasta cantidad de datos acerca del taxa y de especies presentes en un hábitat, redefiniendo la diversidad procariota (Steele y Wolfgang, 2005). De esta manera este tipo de estudios han revolucionado la ecología microbiana: por ejemplo, suelos que han mostrado ser poco diversos cuando se analizan con técnicas de cultivo tradicional, han

mostrado, mediante el análisis de 16S, ser los hábitat más ricos en diversidad de procariotas sobre la tierra (Steele y Wolfgang, 2005).

En consecuencia, el estudio de ADN en suelo tiene un gran potencial, pero también tienen grandes inconvenientes como la reproducibilidad de los ácidos nucleicos o la revelación genética microbiana total que se obtiene. Pero las desventajas que muestra esta técnica son solventadas por los resultados que da la determinación de los ácidos grasos (fosfolípidos) de membrana (PLFA) (Zelles, 1999). Esta técnica proporciona una medición amplia de la biodiversidad del suelo a nivel fenotípico, en contraposición del ADN, por lo que su utilización como indicador biológico suele proporcionar mejores resultados que nos permiten comprender cómo puede evolucionar la comunidad microbiana de un determinado suelo.

El análisis de ácidos grasos se basa en el estudio de estos componentes esenciales de la membrana celular de las células vivas, que en condiciones naturales son una proporción relativamente constante de la biomasa de los organismos (Lechavalier, 1977) (Figura 5). De esta manera, es posible obtener un patrón representativo de especies aisladas o de ecosistema microbiano enteros (Zelles, 1999), ya que sólo las células vivas viables poseen membranas no alteradas, con ácidos grasos como los fosfolípidos [denominados en la literatura inglesa como PLFA, (phospholipids fatty acids, expresión en inglés que significa, ácido graso fosfolipídico)]. El análisis del patrón de éstos ácidos grasos, que se realiza a través de la identificación y cuantificación de sus ésteres metílicos (denominados en la literatura inglesa como FAME (fatty acids methyl esters, expresión en inglés que significa ésteres metílicos de ácidos grasos), mediante cromatografía gaseosa o de capa fina; cuyo patrón es característico para cada género y especie (MIDI, 1990; Liu, 1994). Este tipo de análisis de los ecosistemas microbianos se ha utilizado con tres variantes: (i) aplicación a microorganismos aislados mediante técnicas microbiológicas tradicionales (métodos FAME-MIDI), donde la identificación se realiza mediante el empleo de una base de datos (MIDI, 1990); (ii) identificación de relaciones entre grupos de microorganismos basado en ácidos grasos característicos de especies o géneros, como el caso de las evaluaciones de ergosterol (ácido graso propio de hongos) (Joergensen, 2000; Ruzicka et al., 2000); y (iii) el análisis de ecosistemas microbianos enteros, sin etapas de aislamiento de especies, donde se estudian ácidos grasos que identifiquen comunidades u organismos específicos, con fines ambientales (Tabla 3) (Nielsen y Petersen, 2000; Olsson et al., 1999; Olsson y Persson, 1999; Schutter y Dick,

2000). Ésta última estrategia permite definir y agrupar suelos con características funcionales determinadas (niveles de carbono, fertilidad, actividades enzimáticas, etc.) (Maire et al., 1999), así como la identificación de las comunidades de microorganismos (Zelles, 1999).

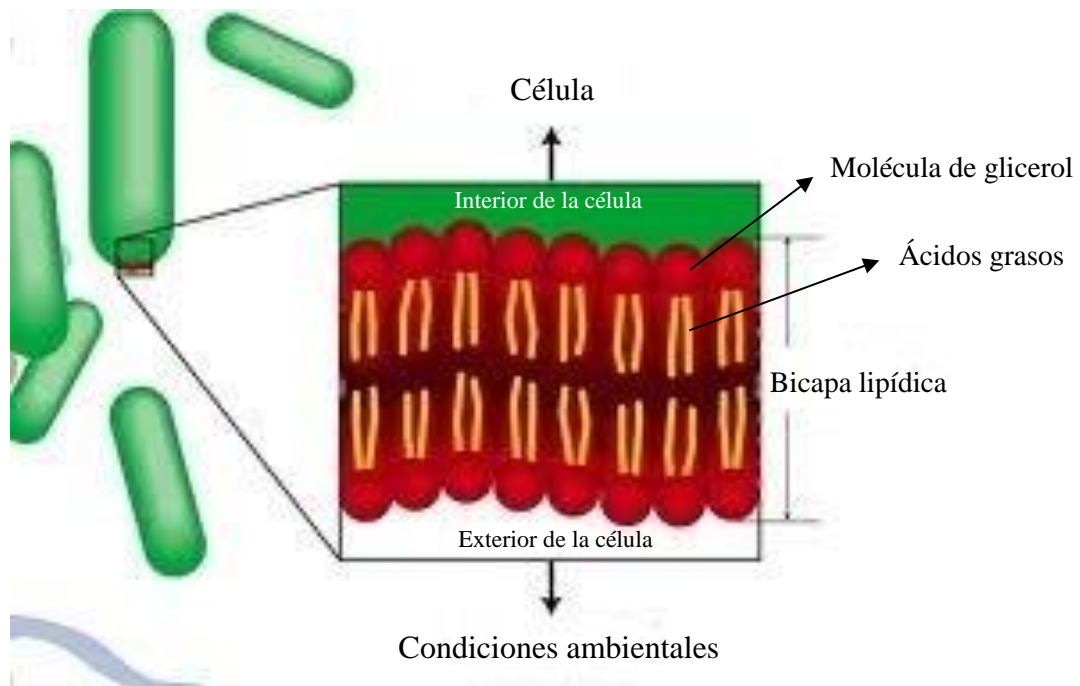


Figura 5. Detalle de la membrana celular de una bacteria

A diferencia del estudio de ADN, en el estudio de PLFAs del suelo no podemos conocer qué tipos de bacterias u hongos se encuentran en el suelo (género y especie), pero sí se puede conocer la evolución de grupos de microorganismos del suelo, tales como los descritos en la Tabla 3.

Tabla 3. Resumen de los patrones más importantes de fosfolípidos que pueden ser utilizados para determinar la composición comunitaria de la microbiota del suelo (Zelles, 1999).

Grupo microbiano	Patrón de fosfolípidos
Archaeobacteria	Residuos grasos con una unión éter a glicerol
Bacterias Anaeróbicas	Contienen esfingolípidos que están ausentes en los aeróbicos
Bacterias en general	Ácidos grasos saturados y monoinsaturados con unión éster a glicerol
Bacterias Gram negativa	Contienen mayor cantidad de ácidos grasos hidroxilados
Bacterias Gram positiva	Contienen mayor cantidad de ácidos grasos ramificados
Cyanobacteria (y eucariotas)	Contienen ácidos grasos poli-insaturados.
Hongos	Presentan un fosfolípidos específico, como: 18:2 6 ó ergosterol.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

Como consecuencia de los efectos ocasionados por el cambio climático, se prevé en los próximos años un importante cambio en la agricultura, y en concreto, en la productividad de los cultivos en la Europa mediterránea, probablemente debido a que en los suelos agrícolas mediterráneos, la disponibilidad del agua es un factor clave y crítico para el funcionamiento de dicho ecosistema.

En consecuencia, el objetivo principal de esta memoria de Tesis ha sido el estudiar bajo condiciones de sequía severa, cómo afecta al suelo algunas prácticas agrícolas comunes en la agricultura mediterránea, como son:

- 1) La aplicación de materia orgánica al suelo con el objeto de que su mineralización proporcione nutrientes a los cultivos
- 2) La aplicación de plaguicidas que puedan afectar negativamente el desarrollo de los cultivos., con el objeto de minimizar pérdidas económicas.

De forma más concreta se describen los siguientes objetivos específicos planteados durante el desarrollo del trabajo:

Objetivo 1

Comprende el estudio del efecto de una sequía severa prolongada durante un año sobre la evolución de varias variables biológicas y químicas (especialmente las que expresan la calidad de la materia orgánica), y cómo estas variables se relacionan con los diferentes tipos de residuos orgánicos aplicados.

De esta forma y para alcanzar este objetivo, los parámetros evaluados fueron:

- Carbono de la biomasa microbiana. Actividad enzimática o-difenol oxidasa.
- Carbono soluble en agua. Carbono de ácidos húmicos. Carbono de ácidos fúlvicos.
- Distribución del peso molecular de las proteínas.
- Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{13}C de estado sólido.

Objetivo 2

Hoy en día, apenas hay información sobre la actividad enzimática y la comunidad microbiana en suelos con diferentes enmiendas orgánicas durante un largo período seco. Por tanto, el segundo objetivo de este estudio fue examinar, bajo condiciones controladas de laboratorio, la respuesta de la comunidad microbiana y la actividad enzimática de un suelo semiárido sometido a sequía severa y continuada durante un año y enmendado con tres fuentes de materia orgánica.

Para alcanzar este objetivo, se evaluaron los siguientes parámetros:

- Estudio y evolución de actividades enzimáticas en suelo, tales como deshidrogenasa, ureasa, β -glucosidasa y fosfatasa.
- Estudio de la biodiversidad microbiana del suelo mediante el estudio de los ácidos grasos de membrana (PLFAs).

Objetivo 3

Comprende el estudio de la evolución de dos plaguicidas (oxifluorfen y clorpirifos) muy utilizados en la agricultura mediterránea en condiciones de sequía y su relación con la biología del suelo.

Para alcanzar este objetivo, se evaluaron los siguientes parámetros:

- Evolución de oxifluorfen y clorpirifos.
- Estudio y evolución de actividades enzimáticas en suelo, tales como deshidrogenasa, ureasa, β -glucosidasa y fosfatasa.
- Estudio de la biodiversidad microbiana del suelo mediante el estudio de los ácidos grasos de membrana (PLFAs).

3. MATERIALES Y METODOS

3. Materiales y métodos

Para alcanzar los objetivos de este trabajo de Tesis, los experimentos se realizaron en laboratorio, bajo condiciones controladas. Es decir, se usaron distintos microcosmos.

Existe una amplia bibliografía en la que se destacan importantes críticas a los estudios realizados en microcosmos o mesocosmos, ya que los microorganismos en condiciones naturales de campo rara vez pueden experimentar las condiciones óptimas con las que se trabaja en laboratorio (Oburger y Jones, 2009). Por otra parte, otros autores sugieren que la mayoría de las incubaciones de laboratorio requieren tratamientos altamente procesados que alteran la estructura del suelo natural, generando otra alteración de las condiciones de campo (Young y Crawford, 2004), lo cual tiene implicaciones para la dinámica del agua debido a la alteración de los agregados estructurales (Beare et al., 2009), y para la dinámica de la comunidad microbiana.

A pesar de estas críticas, desde finales los años 70, se vienen aceptando estudios de microcosmos en laboratorio, indicando que los mismos son funcionalmente similares a los ecosistemas naturales que simulan (Draggan, 1977; Leffler, 1978; Gillet y Witt, 1980). Como consecuencia de ello, hoy en día se siguen utilizando tanto los microcosmos como los mesocosmos, principalmente cuando se realizan experimentos de contaminación del medio ambiente. Esto es lógico, pues en tales microcosmos solo se contamina una parte de suelo y el contaminante está totalmente controlado por el investigador.

Los motivos por los que los estudios se llevaron a cabo en microcosmos en lugar de realizarlos en campo, son los siguientes:

- 1) Necesitábamos establecer un periodo de sequía largo y prolongado de un año. El estudio directo en campo no nos aseguraba que, durante todo un año, no hubiese ningún tipo de precipitación.
- 2) Además de controlar el periodo de sequía se contaminó el suelo con dos plaguicidas. En consecuencia, se consideró apropiado el estudio en microcosmos para no contaminar un suelo de forma consciente.

3.1. CARACTERÍSTICAS DEL SUELO, RESIDUOS ORGÁNICOS Y PLAGUICIDAS UTILIZADOS

El suelo agrícola utilizado para el desarrollo de esta memoria fue un Regosol arénico calcáreo (FAO, 2014) situado en el término municipal de Dos Hermanas (Sevilla). Se cogió suelo de los primeros 25 cm del horizonte superficial (Ap). Una vez trasladado al laboratorio, se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se tamizó con un tamiz de luz de malla de 2 mm. Por último, las muestras se guardaron en botes de plástico hasta su análisis físico-químico.

Con respecto a los residuos orgánicos utilizados, se emplearon tres residuos orgánicos:

- 1) Residuo sólido urbano (MSW)
- 2) Estiércol de vaca (CM)
- 3) Estiércol de oveja (SM)

Los residuos fueron compostados hace 5 años, y desde entonces, los mismos se guardan en cámaras frigoríficas con el objeto de que dicha materia orgánica no se degrade. Dichos residuos fueron compostados bajo condiciones aeróbicas en una pila trapezoidal (4 m de largo, 2 m de ancho en la base y 1 m de altura) que contenía aproximadamente 5000 kg de cada residuo orgánico. Las pilas se voltearon cada dos semanas y se añadió agua regularmente para mantener los niveles de humedad adecuados. Con el fin de evitar posibles alteraciones en la microflora y las pérdidas de $\text{NH}_4^+\text{-N}$, no se permitió que la temperatura excediera de 60-65 ° C. Para el MSW, el compostaje duró unos 6 meses, mientras que en el caso de CM y SM, el compostaje duró aproximadamente unos 4 meses, respectivamente. Estos residuos orgánicos se emplearon solo en dos de los tres manuscritos publicados.

La Tabla 4 muestra las características físico-químicas del suelo y de los tres residuos orgánicos utilizados en esta memoria de Tesis.

3. Materiales y métodos

Tabla 4. Características del suelo, residuos orgánicos experimentales y grupos funcionales ácidos de los ácidos húmicos aislados de los residuos orgánicos (media \pm error estándar, n = 3)

	Suelo	MSW	CM	SM
pH (H ₂ O)	7,9 \pm 0,2	6,8 \pm 0,2	8,2 \pm 0,3	7,7 \pm 0,2
Arena gruesa (g kg ⁻¹)	486 \pm 49			
Arena fina (g kg ⁻¹)	130 \pm 25			
Limo (g kg ⁻¹)	123 \pm 29			
Arcilla (g kg ⁻¹)	260 \pm 35			
N-Kjeldahl (g kg ⁻¹)	0,93 \pm 0,08	11,8 \pm 1,4	6,8 \pm 1,8	8,5 \pm 1,2
Materia orgánica (g kg ⁻¹)	17,2 \pm 1,8	564 \pm 18	251 \pm 14	332 \pm 21
C ácidos húmicos (mg kg ⁻¹)	3250 \pm 64	4647 \pm 42	6911 \pm 58	9365 \pm 75
Acidez total (cmol _c kg ⁻¹)	Nd	4,1 \pm 0,2	4,4 \pm 0,3	4,8 \pm 0,3
Carboxílicos (cmol _c kg ⁻¹)	Nd	3,1 \pm 0,2	3,3 \pm 0,3	3,5 \pm 0,2
Hidroxilofenólicos (cmol _c kg ⁻¹)	Nd	1,0 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	1,3 \pm 0,2
C ácidos fúlvicos (mg kg ⁻¹)	2933 \pm 22	4115 \pm 67	4539 \pm 54	7375 \pm 57
P (g kg ⁻¹)	14,5 \pm 2,2	12,3 \pm 1,5	21,9 \pm 1,6	25,1 \pm 1,9
K (g kg ⁻¹)	20,3 \pm 2,4	11,0 \pm 1,8	25,2 \pm 2,3	22,8 \pm 1,6
Fe (mg kg ⁻¹)	13,9 \pm 2,8	798 \pm 43	355 \pm 27	967 \pm 24
Cu (mg kg ⁻¹)	10,4 \pm 2,2	4,2 \pm 0,9	21,8 \pm 2,4	7,3 \pm 1,4
Mn (mg kg ⁻¹)	9,7 \pm 1,5	20,3 \pm 3,5	16,7 \pm 3,7	78,9 \pm 7,7
Zn (mg kg ⁻¹)	6,6 \pm 1,9	44,8 \pm 6,4	9,2 \pm 2,6	68,3 \pm 6,9
Cd (mg kg ⁻¹)	4,7 \pm 1,3	1,3 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2	1,5 \pm 0,4
Pb (mg kg ⁻¹)	2,4 \pm 0,8	1,1 \pm 0,2	3,8 \pm 1,1	1,3 \pm 0,2
Ni (mg kg ⁻¹)	1,8 \pm 0,3	1,4 \pm 0,3	1,7 \pm 0,4	2,2 \pm 0,5

MSW: Residuo Sólido Urbano

CV: Estiércol de Vaca

SM: Estiércol de Oveja

Nd: No determinado

3. Materiales y métodos

Por otra parte, y para estudiar el efecto y comportamiento de productos fitosanitarios utilizados en la agricultura en un suelo sometido a sequía severa se utilizaron dos tipos de plaguicidas:

- 1) el herbicida oxifluorfen [2-cloro-1-(3-etoxi-4-nitrofenoxi)-4-(trifluorometil) benceno] ($C_{15}H_{11}ClF_3NO_4$) que es un difeniléter con actividad herbicida residual y de contacto, selectivo, absorbido más fácilmente por las hojas, especialmente por los brotes, que por las raíces, con muy poca translocación (Figura 6). Se define como únicamente de contacto sin efecto sistémico. Utilizado en una gran cantidad de cultivos, tales como algodón, cítricos, hortalizas, etc. En nuestra región es muy utilizado también en el cultivo del olivo para la obtención de aceite de oliva. Para este trabajo, se utilizó la formulación comercial Fenfen (24% p v⁻¹, 240 g l⁻¹) de Lainco, S.A. (España).

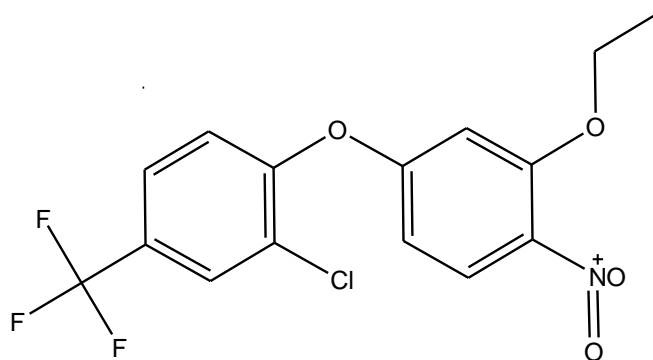


Figura 6. Estructura del Oxifluorfen ($C_{15}H_{11}ClF_3NO_4$)

- 2) el insecticida clorpirifos (*O,O*-dietil-*O*-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato) ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$) que es un insecticida que posee una acción por contacto, ingestión e inhalación en insectos chupadores y masticadores, afectando el sistema nervioso del insecto y provocando la muerte del mismo (Figura 7). Para este trabajo, se utilizó la formulación comercial Senator 48 (48% clorpirifos) de Bayer CropScience (España).

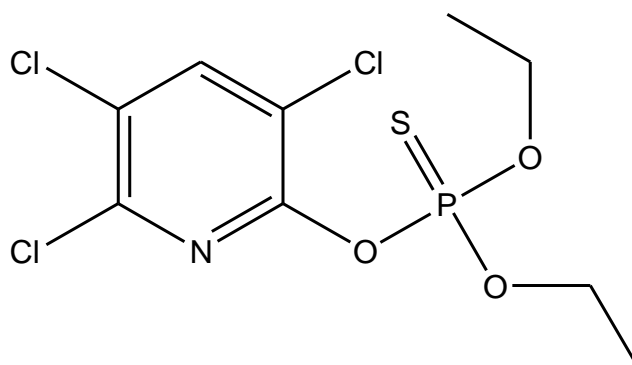


Figura 7. Estructura del Clorpirifos ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$)

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para alcanzar los objetivos descritos anteriormente, se realizaron dos tipos de experiencias de incubación. La primera experiencia de incubación, donde se utilizaron las distintas fuentes de materia orgánica, se realizó con la intención de alcanzar los objetivos 1 y 2 anteriormente definidos. La segunda experiencia de incubación, donde se utilizaron los dos plaguicidas, se realizó con la intención de alcanzar el objetivo 3 previamente definido. Por ello, a partir de ahora hablaremos de primera experiencia de incubación y de segunda experiencia de incubación.

3.2.1. Primera experiencia de incubación

Para estudiar la evolución de las propiedades bioquímicas, comunidad microbiana y estructura de las tres fuentes de materia orgánica estudiadas bajo condiciones de sequía, se utilizaron contenedores de plástico con una capacidad de 5 L donde se les añadió 2 kg del suelo experimental (secado a temperatura ambiente y tamizado con tamiz de 2 mm de luz de malla). Los contenedores se enmendaron con las tres fuentes de materia orgánica ya mencionadas a una dosis de 30 t ha^{-1} (materia seca) en el caso del MSW, una dosis de $67,41 \text{ t ha}^{-1}$ (materia seca) en el caso de CM y una dosis de $52,55 \text{ t ha}^{-1}$ (materia seca) en el caso de SM, con el objeto de aplicar en todos los casos la misma cantidad de materia orgánica al suelo experimental ($16,92 \text{ t materia orgánica ha}^{-1}$). Estas dosis fueron escogidas de forma aleatoria. De la misma forma, se utilizó un suelo control sin enmendar.

Se realizaron dos lotes con estos tratamientos fertilizantes. Uno de ellos se fue regando periódicamente con agua destilada. Cada 7 días se pesaba el contenedor y se calculaba la pérdida de agua por diferencia de pesada, restableciendo posteriormente dicha agua. Se mantuvo la humedad al 40-60% de su capacidad de campo durante un

3. Materiales y métodos

periodo de 365 días. El segundo lote se dejó sin regar durante todo el periodo experimental. De forma detallada, los tratamientos fertilizantes se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Nomenclatura de las muestras en la primera experiencia de incubación y el tratamiento al que corresponde.

Nomenclatura	Tratamiento aplicado
S	Suelo no abonado orgánicamente y regado periódicamente durante el experimento
S+MSW	Suelo abonado con residuo sólido urbano (MSW) y regado periódicamente durante el experimento
S+CM	Suelo abonado con estiércol de vaca (CM) y regado periódicamente durante el experimento
S+SM	Suelo abonado con estiércol de oveja (SM) y regado periódicamente durante el experimento
SD	Suelo no abonado orgánicamente y no regado durante el experimento
SD+MSW	Suelo abonado con residuo sólido urbano (MSW) y no regado durante el experimento
SD+CM	Suelo abonado con estiércol de vaca (CM) y no regado durante el experimento
SD+SM	Suelo abonado con estiércol de oveja (SM) y no regado durante el experimento

Cada tratamiento se realizó por triplicado (24 contenedores de plástico en total). Dichos contenedores se colocaron de forma aleatoria en una cámara de incubación con temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). En suelos regados, el contenido de humedad se controló gravimétricamente y la pérdida de humedad se restituyó con agua destilada, según fuera necesario.

El periodo de incubación fue de un año completo. Durante dicho periodo se cogieron 30 gramos de suelo para realizar los pertinentes análisis. Las muestras se guardaron en congelador a -20 °C hasta su análisis. En este sentido, se tomaron muestras de todos los tratamientos (24 contenedores de plástico en total) a los 30, 100, 200 y 365 días de haber iniciado dicho experimento.

En dichas muestras se realizaron las siguientes determinaciones analíticas:

- 1) Propiedades químicas: determinación de C soluble en agua, C de ácidos húmicos y C de ácidos fúlvicos
- 2) Composición de la materia orgánica en suelo mediante el uso de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{13}C de estado sólido
- 3) Propiedades bioquímicas: determinación de C la biomasa microbiana y distintas actividades enzimáticas (deshidrogenasa, ureasa, β -glucosidasa, fosfatasa, O-difenol oxidasa).
- 4) Biodiversidad de la comunidad microbiana del suelo, mediante el análisis de los ácidos grasos de membrana (PLFAs).

3.2.2. Segunda experiencia de incubación

Para estudiar la evolución de los dos plaguicidas estudiados y su comportamiento sobre las propiedades bioquímicas del suelo, se utilizaron contenedores de cristal con una capacidad de 5 L donde se les añadió 2 kg del suelo experimental (seco a temperatura ambiente y tamizado con tamiz de 2 mm de luz de malla). A diferencia de los experimentos anteriores, los contenedores fueron de cristal, ya que no es recomendable en caso de estudios de contaminación el uso de contenedores de plástico, ya que el contaminante puede adherirse a algún componente químico del plástico que conforma el contenedor.

Los contenedores fueron contaminados con tres dosis distintas de oxifluorfen (2, 4 y 8 l ha⁻¹, respectivamente, siendo 4 l ha⁻¹ la dosis recomendada por el fabricante) y tres dosis distintas de clorpirifos (2,5, 5 y 10 l ha⁻¹, respectivamente, siendo 5 l ha⁻¹ la dosis recomendada por el fabricante).

También se realizaron dos lotes con estos tratamientos. El procedimiento a seguir también fue el mismo, es decir, uno de ellos se fue regando periódicamente con agua destilada, manteniendo una humedad al 40-60% de su capacidad de campo, durante un

3. Materiales y métodos

periodo de 120 días. El segundo lote, se dejó sin regar durante dicho periodo experimental. El motivo de no realizar el experimento durante un año se debió a que la persistencia en suelo de los plaguicidas es inferior a los 365 días. De forma detallada, los tratamientos se muestran en la tabla 6.

Cada tratamiento se realizó por triplicado (42 contenedores de cristal en total). Dichos contenedores se colocaron de forma aleatoria en una cámara de incubación con temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). En suelos regados, el contenido de humedad se controló gravimétricamente y la pérdida de humedad se restituyó con agua destilada, según fuera necesario.

El periodo de incubación fue de 120 días. Durante dicho periodo se cogieron 30 gramos de suelo para realizar los pertinentes análisis. Las muestras se guardaron en congelador a -20°C hasta su análisis. En este sentido, se cogieron muestras de cada tratamiento (24 contenedores de vidrio en total) a los 5, 12, 26, 50, 79, 100 y 120 días de haber iniciado dicho experimento.

En dichas muestras se realizaron las siguientes determinaciones analíticas:

- 1) propiedades bioquímicas: determinación de distintas actividades enzimáticas (deshidrogenasa, ureasa, β -glucosidasa, fosfatasa).
- 2) biodiversidad de la comunidad microbiana del suelo, mediante el análisis de los ácidos grasos de membrana (PLFAs).
- 3) determinación de los plaguicidas experimentales

3. Materiales y métodos

Tabla 6. Nomenclatura de las muestras en la segunda experiencia de incubación y el tratamiento al que corresponde.

Nomenclatura	Tratamiento aplicado
S	Suelo no contaminado y regado durante el experimento
S+O1	Suelo tratado con oxifluorfen (4 l ha^{-1}) y regado periódicamente durante el experimento
S+O2	Suelo tratado con oxifluorfen (2 l ha^{-1}) y regado periódicamente durante el experimento
S+O3	Suelo tratado con oxifluorfen (8 l ha^{-1}) y regado periódicamente durante el experimento
S+CL1	Suelo tratado con clorpirifos (5 l ha^{-1}) y regado periódicamente durante el experimento
S+CL2	Suelo tratado con clorpirifos ($2,5 \text{ l ha}^{-1}$) y regado periódicamente durante el experimento
S+CL3	Suelo tratado con clorpirifos (10 l ha^{-1}) y regado periódicamente durante el experimento
SD	Suelo no contaminado y no regado durante el experimento
SD+O1	Suelo tratado con oxifluorfen (4 l ha^{-1}) y no regado durante el experimento
SD+O2	Suelo tratado con oxifluorfen (2 l ha^{-1}) y no regado durante el experimento
SD+O3	Suelo tratado con oxifluorfen (8 l ha^{-1}) y no regado durante el experimento
SD+CL1	Suelo tratado con clorpirifos (5 l ha^{-1}) y no regado durante el experimento
SD+CL2	Suelo tratado con clorpirifos ($2,5 \text{ l ha}^{-1}$) y no regado durante el experimento
SD+CL3	Suelo tratado con clorpirifos (10 l ha^{-1}) y no regado durante el experimento

3.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

A continuación se detallan las determinaciones realizadas en suelos y residuos orgánicos.

3.3.1. Determinación de parámetros físicos

3.3.1.1. Determinación de la textura

Se determinó según el método descrito por Soil Survey of England and Wales (1982). El procedimiento seguido se describe a continuación:

A una muestra de suelo situada en baño de arena se le añaden cantidades sucesivas de agua oxigenada (30%) hasta completa destrucción de materia orgánica. Posteriormente, se añaden cantidades sucesivas de ácido clorhídrico 0,1 M con el objeto de destruir los carbonatos que tenga el suelo.

Se toman 30 g de suelo y se mezclan con 300 ml de agua destilada y 15 ml de hexametáfosfato sódico. Posteriormente se agita la muestra en un agitador rotatorio, y se pasa el contenido a una probeta de 1000 ml, utilizando para ello un tamiz de malla de 0,063 mm, que permite separar la fracción arena de las de limos y arcillas.

Las arenas se llevan a una cápsula de porcelana que se introduce en estufa a una temperatura de 105 °C. Una vez secadas, se tamizan con tamiz de luz de malla de 0,1 mm, para separar arena fina de arena gruesa. Posteriormente y por diferencia de pesadas se calcula el porcentaje de ambas fracciones.

En la probeta enrasada se extraen mediante la pipeta Robinson las fracciones de limos y arcillas de acuerdo con los tiempos internacionalmente admitidos y teniendo en cuenta la temperatura. Ambas extracciones por separado se llevan a sendas cápsulas de porcelana en las que, previo secado en estufa, se determina el peso de la arcilla y limos de la muestra.

3.3.2. Determinación de parámetros químicos

3.3.2.1. Determinación del pH

La determinación de pH se realizó siguiendo el método descrito en MAPA (1994). Para ello, dicha determinación se realizó añadiendo agua destilada al suelo con una proporción 1/2,5 (p/v). Para ello, tras la adición de agua a la muestra de suelo se agita durante 10 minutos y posteriormente se deja reposar 30 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se determina el pH con ayuda del pH-metro.

3.3.2.2. Determinación del N-Kjeldahl

La determinación del N-Kjeldahl se realizó siguiendo el método descrito en MAPA (1994). El método consiste en convertir las distintas formas de nitrógeno del suelo en NH_4^+ , que servirá para determinar el contenido en nitrógeno de la muestra. Para ello, se realiza una digestión ácida y posterior arrastre de vapor del nitrógeno amoniacal desprendido en medio alcalino.

Para ello, se pesan 5 g de suelo y se colocan en un tubo de digestión junto con 20 ml de H_2SO_4 concentrado y una cucharadita de una mezcla formada por sulfato de cobre, sulfato de potasio y selenio, catalizadores de la reacción de digestión (la reacción de digestión se lleva a cabo a una temperatura de 360 °C, durante 2,5 h, en un sistema digestor conectado a un extractor de gases). A continuación se deja enfriar el tubo el tiempo necesario y se añade agua destilada con mucha precaución (aproximadamente 75 ml). Se filtra y enrasa en un matraz aforado de 100 ml. La destilación de la muestra se realiza sobre una parte alícuota (10 ml), añadiendo sosa concentrada hasta aparición de color negro; con ello, se desplaza el amoníaco que por arrastre se recoge en 25 ml de H_2SO_4 (0,1 N) y unas gotas de indicador mixto. Finalmente, se valora el H_2SO_4 (0,1 N) con NaOH (0,1 N). Análogamente, se trabaja del mismo modo con una muestra en blanco, sin presencia de suelo.

El contenido en nitrógeno de la muestra se expresa en porcentaje, teniendo en cuenta que 1 ml de H_2SO_4 (0,1 N) corresponde a 1.4 mg de nitrógeno.

Cantidad de nitrógeno (mg) en la alícuota (Nal):

$$Nal = (B - M) \times mlH_2SO_4 \times f \times 1,4 \frac{mg\ N}{ml\ H_2SO_4}$$

Cantidad de nitrógeno (g) en la muestra (Nm):

$$Nm = Nal \times 10 \times 10^{-3}$$

Proporción de nitrógeno en el suelo:

$$\%N = \frac{Nm}{P} \times 100$$

donde:

P = peso de suelo empleado en la muestra (g)

B = volumen de NaOH empleado en la valoración del blanco (ml).

M = volumen de NaOH empleado en la valoración de la muestra (ml).

$B-M$ = volumen de ácido sulfúrico neutralizado en la valoración (ml).

f = factor de pureza del NaOH.

3.3.2.3. Determinación del C-orgánico total

Se determinó según el método descrito por Yeomans y Bremner (1989), el cual consiste en una oxidación del carbono orgánico con dicromato potásico en medio ácido, y posterior valoración con sal de Mohr del exceso de dicromato.

Para ello, se pesan entre 0,1 y 0,5 g de muestra, y se añaden 5 ml de dicromato potásico 1N y 7,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se colocan en la estufa a 170 °C durante media hora y una vez frío, se añaden 5 ml de ácido fosfórico concentrado y agua destilada hasta un volumen de 50 ml aproximadamente. A continuación se valora el exceso de dicromato con sal de Mohr 0,5 N en presencia del indicador. El punto final es el cambio de color de azul a verde. Paralelamente se preparan blancos en frío y en caliente (media hora en estufa a 170 °C).

El porcentaje de carbono orgánico total oxidable (Corg) se obtiene según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ COT} = \frac{(A) \times (N \text{ sal de Mohr}) \times 0,003}{\text{g de muestra}} \times 100$$

donde:

$$A = [(BC - S) \times (BF - BC) / BF] + (BC - S)$$

BC = ml de sal de Mohr gastados por el blanco caliente

BF = ml de sal de Mohr gastados por el blanco frío

S = ml de sal de Mohr gastados por la muestra

N = Normalidad de sal de Mohr.

Para suelos, el contenido de materia orgánica se calcula multiplicando el contenido de carbono orgánico total del suelo por el factor 1,724 (Tabatabai, 1996).

3.3.2.4. Determinación del C de ácidos húmicos y ácidos fúlvicos

Las sustancias húmicas se obtuvieron mediante un procedimiento convencional (Kononova, 1966; Schnitzer, 1982), basado en la extracción alcalina con pirofosfato sódico, acidificación, separación de ácidos húmicos y fúlvicos de acuerdo a su diferente solubilidad a distintos valores de pH, eliminación de impurezas y liofilización.

La presencia de carbonatos en el suelo se eliminó por agitación mecánica de la muestra de suelo durante 30 minutos con H_3PO_4 2 M, repitiendo tres veces este tratamiento. Después se lavaron las muestras de suelo con agua destilada hasta que la suspensión alcanzó pH 7. Seguidamente, se realizó una extracción con $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0,1 M (pH 9.8) en la proporción 1:10 (suelo/extractante) y posteriormente con NaOH 0,1 M, a temperatura ambiente. Cada extracción se repitió tres veces, agitando mecánicamente durante 3 horas, centrifugado a 15300g durante 15 minutos y filtrando el sobrenadante a través de un papel de filtro Wathman nº 31. Los extractos alcalinos se unieron y se acidificaron con HCl hasta pH 1, dejándolos en nevera durante 24 horas para permitir la

precipitación completa de los ácidos húmicos, los cuales se separaron del sobrenadante (conteniendo los ácidos fúlvicos) mediante centrifugación a 30100g durante 15 minutos.

Los ácidos húmicos obtenidos se purificaron disolviéndolos en hidróxido sódico 0,1 M, centrifugando a 30100g y desechando el residuo. El sobrenadante se acidificó con ácido clorhídrico concentrado hasta pH 1. La suspensión se dejó en reposo durante 12 horas a temperatura ambiente y después se centrifugó a 30100 g durante 15 minutos. Los ácidos húmicos precipitados se lavaron con agua destilada, se dializaron y finalmente se liofilizaron.

La purificación de los ácidos fúlvicos se llevó a cabo pasando el filtrado ácido a través de una columna de resina XAD-8. Los ácidos fúlvicos fijados por adsorción, se recuperaron eluyendo con NaOH 0,1 M, se eliminaron los cationes haciéndolo pasar por una resina de intercambio iónico Amberlyst 15 y finalmente se liofilizaron.

El C de los ácidos húmicos y fúlvicos se determina por el método de Yeomans y Bremner (1989), descrito con anterioridad.

3.3.2.5. Estudio de los grupos funcionales de los ácidos húmicos

Se disolvieron 30 mg de sustancia húmica en 50 ml de agua destilada, se añadió KOH hasta pH 10, se ajustó a fuerza iónica 0,1 M con KNO₃, y se agitó durante una hora en atmósfera de nitrógeno. A continuación, se añadió con HNO₃ 0.1 M hasta pH 3,5 y se tituló con KOH 0,1 M hasta pH 10,5.

La valoración se realizó a 25°C, con agitación constante y en atmósfera de nitrógeno, añadiendo alícuotas de entre 0.02 y 0.1 ml de la disolución valorante, con objeto de que la variación del potencial del electrodo fuera menor de 10 mV. Se registraron el volumen añadido de base y el pH, cuando la lectura del mismo fuera estable durante 30 segundos con una desviación inferior a ± 0.02 mV. Las valoraciones potenciométricas se realizaron con un titulador automático Mettler DL 77 equipado con un electrodo de vidrio Mettler DG-111-SC, que se calibró adecuadamente antes de cada titulación, y con una bureta automática para la adición de reactivo y capaz de controlar la evolución de todos los parámetros durante la valoración.

Se calcularon la fuerza iónica y la concentración de protones en cada punto de la valoración, mediante un procedimiento iterativo a partir de la concentración del

electrolito de fondo y el pH. Con la fuerza iónica calculada, se determinaron los coeficientes de actividad usando la ecuación de Davies (Davies, 1962). La carga relativa neta de la sustancia húmica a un pH y fuerza iónica dados se calculó como la diferencia entre la cantidad de base añadida en cada punto de la titulación de la disolución problema y la cantidad de base que teóricamente se necesitaría añadir a una disolución blanco (sólo con el electrolito de fondo) para alcanzar ese pH.

Una vez calculada la carga en función del pH, el contenido de grupos carboxílicos se estimó como el valor de carga a pH 8 y el de grupos hidroxilo fenólicos como dos veces la diferencia de cargas a pH 8 y 10 (Ritchie y Perdue, 2003). La acidez total se determinó como suma de ambos parámetros.

3.3.2.6. Carbono soluble en agua

El C soluble en agua se realizó añadiendo agua destilada al suelo en una proporción 1:10 p/v a 50°C, agitando durante una hora, seguido por centrifugación a 15.000g durante 15 min (García et al., 1990).

En el extracto, el C fue determinado por el método de oxidación de dicromato, anteriormente descrito (Yeomans y Bremner, 1989).

3.3.2.7. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{13}C de estado sólido

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{13}C en estado sólido es uno de los métodos más importantes para determinar la composición química de compuestos orgánicos del suelo, así como la proporción relativa de las distintas unidades estructurales (Preston, 1996, 2001). Para obtener espectros de alta resolución, en tiempos razonables de adquisición, se aplica a la ^{13}C RMN en estado sólido la denominada polarización cruzada (CP) y la rotación en ángulo mágico. A pesar de tener menor resolución que la RMN en estado líquido, la CPMAS ^{13}C RMN tiene como ventaja la posibilidad de poderse utilizar para el análisis de muestras poco solubles sin necesidad de extracción previa con disolventes orgánicos, evitando problemas de pérdida de material, extracción selectiva o problemas de alteración (Polvillo, 2003).

3. Materiales y métodos

Con el fin de mejorar la resolución y calidad de los espectros, se realizó un pretratamiento con HF 10% a las muestras, descrito por Goncalves et al. (2003), para la eliminación de todas las especies paramagnéticas que puedan interferir en el análisis y concentrar el contenido en materia orgánica. Previo a la desmineralización con HF 10%, fue necesaria la eliminación del carbonato cálcico presente en los suelos, ya que se podrían formar otros compuestos no deseados, como el CaF_2 . Para ello, se trataron los suelos con HCl 1M, tantas veces como fuera necesario; y posteriormente lavadas con agua destilada.

A continuación, 50 ml de HF al 10% se añadieron a 10 g de suelo y se agitó la mezcla durante dos horas. Posteriormente, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, eliminando cuidadosamente el sobrenadante mediante sifonación. Este proceso se llevó a cabo 4 veces. Tras el ataque con HF 10%, el suelo fue lavado con 50 ml de agua destilada, tantas veces como fuese necesario hasta alcanzar un pH 5-6; y sometido al proceso de liofilización antes de realizar las medidas de RMN.

Los resultados de los análisis de RMN se obtuvieron con un equipo Bruker DSX 200, a una frecuencia de resonancia de ^{13}C de 50,32 MHz usando rotores de dióxido de circonio de 7 mm de diámetro externo, con tapón de policlorotrifluoretileno (PCTFE o Kel-F®).

La técnica de polarización cruzada se aplicó durante la rotación del ángulo mágico a 6,8 kHz. El tiempo de contacto fue de 1 ms y el intervalo entre pulsos de 1 Hz de forma escalonada, empezando entre el 100% y el 50% de la potencia inicial para evitar la modulación del spin durante el contacto Hartmann-Hahn (Peersen et al., 1993, Cook et al., 1996). Se acumularon entre 200.00 y 400.000 escáneres, usando un pulso de retardo de 250 ms. Se aplicó una ampliación de la línea entre 100 y 150 Hz.

Para la resolución de los espectros obtenidos, se utilizó el Software MestReNova versión 9 (MestrelabResearch, Santiago de Compostela, España), aplicando una corrección de línea de base de puntos múltiples y corrigiendo la fase, dependiendo de las características de cada espectro. Mediante el software, se procedió a la determinación de la distribución relativa de carbono, integrando la intensidad de la señal en diferentes regiones de desplazamiento químico. Utilizando el tetrametilsilano (TMS) como referencia, con desplazamiento químico (chemicalshift) igual a 0 ppm, se establecieron

3. Materiales y métodos

las diferentes regiones espectrales, asignando a cada una de ellas los compuestos correspondientes, de acuerdo con Knicker y Lüdemann (1995) (Tabla 7).

Tabla 7. Asignación típica de los picos de RMN de ^{13}C en estado sólido a grupos funcionales presentes en muestras geoquímicas. (Referencia tetrametilsilano=0 ppm).

Desplazamiento químico (ppm)	Asignación
220 - 185	Carbonilos
185 - 160	Carboxílicos
160 - 110	Grupos Aromáticos COR o CNR, C-H Aromáticos, C olefinas
110 - 45	O-Alquilo, N-Alquilo
45 - 0	C alquilo

3.3.2.8. Determinación de la distribución del peso molecular de las proteínas

Se siguió la metodología descrita en Gómez et al. (2014). La extracción se realizó con agua desionizada a pH 9, manteniendo la temperatura a 55 °C durante 3 horas. La distribución de las proteínas se determinó por cromatografía de exclusión de tamaño usando un purificador AKTA (GE Healthcare), empleando una columna SuperdexPeptideTM 10 / 300GL (intervalo óptimo de separación <10 - 50 kDa).

Las muestras se centrifugaron a 12000g durante 30 min a 4 ° C para eliminar las moléculas insolubles y el sobrenadante se pasó a través de un filtro de 0,2 μm y se cargó en un bucle de 0,1 ml conectado a un sistema purificador AKTA. La columna se equilibró y se eluyó con tampón Tris-HCl 0,25 M (pH 7,0) en modo isocrático, a una velocidad de flujo de 0,5 ml min⁻¹, y se detectaron proteínas / péptidos a 280 y 215 nm con un módulo GE Healthcare UV900 Acoplado a la columna de elución.

3.3.2.9. Determinación de P asimilable

Para la concentración de P asimilable, se siguió el método de Willians y Stewart (descrito por Guitian y Carballas, 1976), basado en una determinación colorimétrica en la cual se mide la densidad óptica de la disolución de color azul, producida al reducir el

3. Materiales y métodos

complejo fosfomolibdico formado por reacción entre el ácido ortofosfórico y el ácido molibdico. Se calcula la concentración de P por la proporcionalidad existente entre la intensidad de color y la cantidad de ortofosfato presente.

Para ello, se emplean 2 g de suelo y se le añaden 100 ml de disolución extractora (compuesta por CaCO_3 , MgCO_3 , H_2SO_4 y agua destilada a pH 3,2-3,3): Después de agitar durante cinco minutos, se filtra y se procede a la determinación de P.

Se toman 50 ml del filtrado, se diluye hasta un volumen aproximadamente de 80ml con agua destilada y se le añaden 4ml de la disolución de molibdato amónico ($(\text{NH}_4)\text{MoO}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (2,5g de molibdato amónico disueltos en 100 ml de ácido sulfúrico 10N), se lleva a 90-95 ml con agua destilada y se añaden 0,8 ml de disolución de cloruro estannoso (1 g de cloruro estannoso disuelto en 100 ml de ácido clorhídrico al 10%), enrasando a 100 ml y agitando posteriormente. Se mantiene 30 minutos en la oscuridad, al cabo de este tiempo se mide la densidad óptica en un espectrofotómetro a 690 nm.

La concentración de P en la disolución se obtiene por interpolación, a partir de una curva patrón, obtenida a partir de soluciones de P de concentración conocida.

3.3.2.10. Determinación de K asimilable

Se ha seguido el método descrito por Guitian y Carballas (1976), basado en la extracción de dicho elemento con acetato amónico, y posterior determinación en el extracto. Para ello se introducen 5 g de muestra seca en un bote de agitación con 50 ml de solución extractora de acetato amónico. Se agita la muestra durante 30 minutos y a continuación se filtra en un frasco de polietileno. El potasio se determina por fotometría de llama, construyendo una curva patrón a partir de disoluciones de concentración conocida.

3.3.2.11. Determinación de metales pesados totales

Para la determinación de los metales pesados totales, las muestras de suelo y materia orgánica deben ser digeridas previamente.

La muestra se debe mineralizar por vía húmeda en microondas, para ello, se sitúa en el interior de un vaso de teflón de alta presión debidamente seco. El peso que se toma de muestra es de $0,4-0,5 \pm 0,0005$ g. Una vez añadidos los reactivos de digestión (1 ml de

H₂O₂ y 4 ml HNO₃), se introduce en el microondas permaneciendo durante un determinado período de tiempo. Este mineralizado, una vez frío, se introduce en un matraz aforado de 25 ml donde se enrasa a dicho volumen, y se guarda en botella de poliestireno para su almacenamiento en nevera y posterior análisis. A partir del extracto obtenido se determinaron los metales pesados por espectrometría de absorción atómica Pelkin-Elmer 5500.

El cálculo de las concentraciones en metales pesados de las muestras se hace mediante la utilización de patrones de concentración conocida, utilizando HNO₃ diluido.

3.3.3. Determinación de parámetros biológicos

3.3.3.1. Carbono de biomasa microbiana

Se determinó siguiendo el método de fumigación-extracción (Vance et al., 1987). Para ello, 3 g de suelo tamizado y humedecido al 60 % de su capacidad de retención hídrica, se incuban en frascos abiertos de 150 cm³ en la oscuridad durante 24 horas, al cabo de las cuales, se añaden 0,17 ml de cloroformo lavado y se mantienen cerrados durante 30 minutos; seguidamente se añaden 12 ml de sulfato potásico 0,5 M y se agita mecánicamente durante 1 hora. A continuación, se centrifuga a 3400 rpm durante 8 min y se filtra. Paralelamente se preparan también controles sin cloroformo. Al extracto obtenido, se le pasa aire durante 2 minutos para eliminar el cloroformo y sobre dicho extracto se mide el carbono. El carbono se midió en un analizador de carbono para muestras líquidas Shimadzu TOC-5050.

$$C \text{ de la biomasa microbiana} = C \text{ del extracto} \times 2,64$$

El carbono de biomasa microbiana de la muestra vendrá dado por la diferencia entre el carbono de la muestra fumigada con cloroformo y el de la muestra no fumigada.

3.3.3.2. Actividad deshidrogenasa

La actividad deshidrogenasa del suelo se determinó siguiendo el método descrito por Trevors et al. (1982) y modificado por García et al. (1993), cuyo principio se basa en la estimación del iodonitrotetrazolio formazan (INTF) formado por reducción cuando el suelo es incubado con 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT) como aceptor de electrones, en ausencia de tampón (Figura 8).

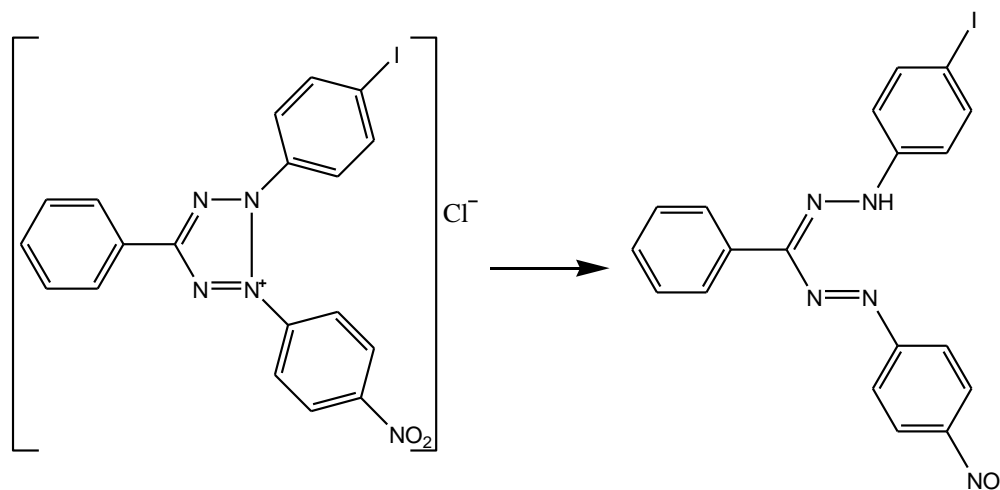


Figura 8. Reacción del 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT) transformándose a iodonitrotetrazolio formazan (INTF)

Para ello, a un gramo de muestra tamizada a 2 mm se le añaden 0,4 ml de agua destilada y 0,2 ml de INT (al 0,4 % peso-volumen). A continuación se deja incubar a 20 °C en completa oscuridad durante 20 horas. Posteriormente, se adicionan 10 ml de metanol y se agita vigorosamente durante 2 minutos, filtrando a continuación. Se preparan paralelamente controles sin INT, en los que a 1 g de suelo se le añade 0,6 ml de agua. El extracto se lee en espectrofotómetro de absorción molecular a 490 nm.

La absorbancia del instrumento es transformada en concentración mediante una recta patrón obtenida con INTF (iodonitrofenil formazan) en distintas concentraciones. La actividad de la muestra se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$ADH = \frac{(C \times V)}{(Pm \times G \times T)}$$

donde:

ADH = actividad deshidrogenasa ($\mu\text{moles INTF formado g}^{-1}\text{h}^{-1}$).

C = cantidad de INTF de la muestra, en $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Pm= peso molecular del INTF ($471,3 \text{ g mol}^{-1}$).

V = factor de dilución.

G = gramos de suelo seco.

T = factor de tiempo de incubación; en este caso 20 horas.

3.3.3.3. Actividad ureasa

La actividad ureasa del suelo se determinó siguiendo el método descrito por Kandeler y Gerber (1988), basado en la determinación del amonio liberado en la incubación de una solución de suelo a 37°C durante 2 h. La determinación del amonio se realiza a través de la reacción de Berthelot. En este método, el amonio producido por la actividad ureasa reacciona con salicilato y dicloroisocianuro, generando un color verde azulado. La absorbancia a 690 nm es directamente proporcional a la concentración de nitrógeno amoniacal.

Para ello, a 1 g de muestra de suelo se añaden 0,5 ml de urea 0,48 % y 4 ml de tampón borato pH 10. Paralelamente se prepara para cada muestra un control con 1 g de suelo y 4 ml de tampón borato pH 10. Además, se prepara un blanco conteniendo 0,5 ml urea 0,48 % y 4 ml de tampón borato pH 10. Muestra, control y blanco, se incuban en baño termostático con agitación a 37°C durante 2 horas. Terminado este período se añaden 0,5 ml de urea 0,48 % al control.

A continuación, en ambos casos, se extrae el amonio liberado utilizando 6 ml KCl 7,4 %, agitando durante 30 minutos. Seguidamente, se centrifuga y filtra la suspensión de suelo, resultando un filtrado de extracto claro en el que se determina amonio por colorimetría como a continuación se detalla.

Para determinar el amonio, a 0,5 ml de extracto se adicionan en el siguiente orden: 4,5 ml de agua destilada, 2,5 de salicilato de Na/NaOH y 1 ml de dicloroisocianuro de sodio, y la mezcla se deja reposar 30 min en oscuridad. La absorbancia se mide en

3. Materiales y métodos

espectrofotómetro de absorción molecular, después de haber ajustado el equipo a cero con el blanco, a una longitud de onda de 690 nm.

La absorbancia medida se transforma en concentración mediante una recta patrón, obtenida con concentraciones conocidas de amonio. Las unidades propuestas para esta actividad enzimática son $\mu\text{moles de N} - \text{NH}_4^+ / (\text{g suelo seco} \times \text{h})$. La actividad de la muestra se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{AU} = \frac{(S - B) \times V}{(\text{Pm} \times G \times T)}$$

donde:

AU = actividad ureasa ($\mu\text{moles de N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ suelo seco h}^{-1}$).

S = cantidad de N-NH_4^+ en las muestras ($\mu\text{g de N-NH}_4^+$) obtenida de la curva patrón.

B = cantidad de N-NH_4^+ ($\mu\text{g de N-NH}_4^+$) para los blancos.

Pm = peso atómico del nitrógeno (14 g mol^{-1}).

V = volumen total del extracto de incubación.

G = gramos de suelo seco.

T = factor de tiempo de incubación (horas).

3.3.3.4. Actividad β -glucosidasa

El método utilizado toma como referencia el descrito por Tabatabai (1982) y Eivazi y Tabatabai (1988), basado en la determinación colorimétrica del p-nitrofenol obtenido por la acción de la β -glucosidasa después de incubar el suelo con el sustrato artificial p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (PNG) en medio tamponado a pH 6 y a temperatura de 37 °C, y extracción del p-nitrofenol liberado por filtración después de la adición de CaCl_2 y tampón THAM pH 12, que en medio básico desarrolla un color amarillo.

Para ello, a 0,5 g de muestra de suelo se le añaden 0,5 ml de sustrato PNG (p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido) 0,025 M y 2 ml de tampón MUB-HCl de pH 6.

3. Materiales y métodos

Paralelamente se prepara para cada muestra un control con 0,5 g de suelo y 2 ml de tampón. Se prepara un blanco conteniendo 0,5 ml de sustrato y 2 ml de tampón. Muestra, control y blanco, se incuban en baño termostático con agitación a 37 °C durante 1 hora. Terminado este período se añaden 0,5 ml de sustrato a los controles.

A continuación, todos los tubos se enfrían a 4 °C en baño con hielo durante 15 minutos, para frenar la reacción enzimática. Pasado este tiempo, se adicionan a todos los tubos, muestra, control y blanco, 0,5 ml de CaCl_2 0,5 M y 2 ml de disolución THAM-NaOH 0,1 M, pH 12. Se agita bien para que la suspensión se mezcle completamente. Seguidamente se centrifugan los tubos a 3000 rpm durante 10 min. Se diluye convenientemente el sobrenadante y se mide su absorbancia en el espectrofotómetro, después de haber ajustado el equipo a cero con el blanco, a una longitud de onda de 400 nm. El CaCl_2 se añade para bloquear la reacción y para provocar la dispersión de coloides que podrían interferir en la lectura espectrofotométrica, y la disolución THAM-NaOH sirve para salificar el producto de reacción obtenido dándole color amarillo.

La absorbancia medida se transforma en concentración mediante una recta patrón obtenida con concentraciones conocidas de PNF. Las unidades propuestas para expresar esta actividad enzimática son $\mu\text{moles PNF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La actividad β -glucosidasa se calcula usando la siguiente ecuación:

$$AG = \frac{(C \times V)}{(Pm \times G \times T)}$$

donde:

AG = actividad β -glucosidasa $\mu\text{mol PNF g}^{-1}\text{suelo seco h}^{-1}$

C = concentración de PNF (μg) en el extracto, según la recta de calibración obtenida.

V = factor de dilución.

Pm= peso molecular del p-nitrofenol (139 g mol^{-1}).

G = gramos de suelo seco.

T = factor relativo al tiempo de incubación, en horas.

3.3.3.5. Actividad fosfatasa alcalina

Esta actividad enzimática se determinó por el método descrito por Tabatabai y Bremer (1969), basado en la determinación espectrofotométrica del p-nitrofenol liberado cuando se incuba el suelo a 37 °C con una disolución tamponada (pH 11,5 para la alcalina) del sustrato artificial p-nitrofenil-fosfato (PNF). El método colorimétrico para medir el p-nitrofenol liberado se basa en el hecho de que las disoluciones alcalinas de este compuesto tienen color amarillo.

Para ello, a 0,5 g de muestra de suelo se le añaden 0,5 ml de p-nitrofenil fosfato 0,025 M y 2 ml de tampón MUB pH 11,5. Paralelamente se prepara para cada muestra un control con 0,5 g de suelo y 2 ml de tampón MUB pH 11,5. Además, se prepara un blanco con 0,5 ml de sustrato y 2 ml de tampón MUB pH 11,5. Muestra, control y blanco, se incuban en baño termostático con agitación a 37 °C durante 1 hora. Terminado este período se añaden 0,5 ml de sustrato a los controles.

A continuación, todos los tubos se enfrían a 4 °C durante 15 minutos, para frenar la reacción enzimática. Pasado este tiempo, se adicionan a todos los tubos, muestra, control y blanco, 0,5 ml de CaCl₂ 0,5 M y 2 ml de NaOH 0,5 M. Se agita bien para que la suspensión se mezcle completamente. Seguidamente se centrifugan los tubos a 3400 rpm durante 10 min. Se diluye convenientemente el sobrenadante y se mide su absorbancia, en el espectrofotómetro, después de haber ajustado el equipo a cero con el blanco, a una longitud de onda de 400 nm.

La absorbancia se transforma en concentración mediante una recta patrón, obtenida con concentraciones conocidas de p-nitrofenol-fosfato. Las unidades propuestas para expresar esta actividad enzimática son $\mu\text{moles p-nitrofenol liberado g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La actividad fosfatasa se calcula usando la siguiente expresión:

$$AP = \frac{(C \times V)}{(P_m \times G \times T)}$$

donde:

AP = actividad fosfatasa ($\mu\text{moles p-nitrofenol liberado g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

C = cantidad p-nitrofenol de la muestra en μg .

V = factor de dilución.

Pm= peso molecular del p-nitrofenol (139 g mol^{-1}).

G = gramos de suelo seco.

T = factor relativo al tiempo de incubación en horas.

3.3.3.6. Actividad o-difenol oxidasa

Esta actividad enzimática se determinó por el método descrito por Perucci et al. (2000). El problema más importante en el estudio de la oxidación de los compuestos fenólicos en los suelos es la baja disponibilidad del sustrato oxidado, causado por la adsorción de los componentes de suelo en la interfase con la catálisis enzimática, dado que se dan reacciones inmediatamente después del contacto del catecol con el suelo. Las quinonas formadas por la oxidación de compuestos fenólicos son altamente reactivas y capaces de formar varios productos de condensación, especialmente en presencia de compuestos con grupos amino libres, este método se basa en la formación de dichos compuestos, a través de la desarrollo de la oxidación enzimática del catecol y posterior reacción con la prolina (Figura 9).

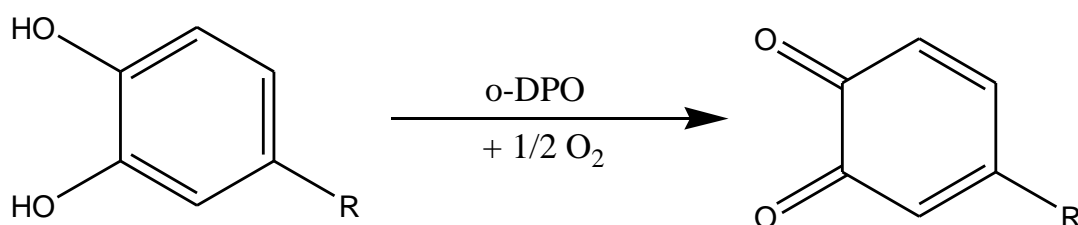


Figura 9. Esquema de la reacción generalizada de la o-difenol oxidasa

Para ello, en tubos de ensayo, a 1 g de suelo fresco se le añade 1,5 ml de una solución 0,2 M de catecol (previamente disuelta en tampón fosfato 0,1 M), 1,5 ml de una solución de 0,2 M de prolina (previamente disuelta en tampón fosfato 0,1 M), y 2 ml de tampón fosfato. Se hace un control igual pero sin la solución de catecol 0,2 M.

Una vez que todas las muestras y controles se incuban durante 10 minutos a 30 °C en baño con agitación, se le añade la solución de catecol a los controles.

La reacción se paraliza mediante enfriamiento en baño de hielo durante 10 minutos, centrifugando la muestra durante 10 minutos y en el sobrenadante y se mide su

absorbancia, en el espectrofotómetro, después de haber ajustado el equipo a cero con el blanco, a una longitud de onda de 525 nm.

Las unidades propuestas para expresar esta actividad enzimática son ($\mu\text{moles catecol oxidado}$)/(10 min \times g_{suelo}). Esta actividad se calcula usando la siguiente expresión:

$$\frac{\mu\text{moles catecol oxidado}}{10 \text{ min} \times g_{\text{suelo}}} = \left[\frac{Abs}{5 \times 10^5} \times \frac{1}{g_{\text{suelo}}} \right] \times 10^6 = \frac{2 \times Abs}{g_{\text{suelo}}}$$

3.3.3.7. Perfil de ácidos grasos de fosfolípidos de membrana (PLFAs)

La extracción de los PLFAs se realizó siguiendo el método descrito por Frostegard et al., (1999) y Bardgett y McAlister (1999). Para ello, se pesaron 4 g de suelo en tubos de centrífuga y se añadió 18,4 ml de reactivo Bligh y Dyer, compuesto de tampón citrato (0,15 M/pH 4)/metanol/cloroformo (1/2/0,8 v/v/v). Estos botes se tapan con tapones de silicona y se agitan durante 2 horas. Posteriormente, se centrifugan a 2500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se decanta en un tubo de centrífuga de 50 ml previamente lavado con cloroformo dos veces y se repite el proceso anterior añadiendo 2,5 ml de reactivo Bligh y Dyer.

Al sobrenadante, se le añaden 6,2 ml de cloroformo y 6,2 ml de tampón citrato. Se agita en vórtex durante 1 minuto y se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos. A continuación, se toman 3 ml de la fase orgánica (en el fondo del tubo) y se transfieren a un tubo de vidrio de 10 ml previamente lavado con cloroformo. Esta fase orgánica se concentra hasta sequedad a 40 °C bajo corriente de N₂ en un concentrador de muestras (TechneDry Block DB 3D) y se tapan con tapón de silicona en atmósfera de N₂. Se conservan a -20 °C.

Para la determinación cromatográfica de los PLFAs, se resuspende el concentrado anterior en 100 μl de n-octano, agitando dos veces con vórtex. Se transfiere a viales cromatográficos mediante pipeta Pasteur. Se disuelven también los patrones cromatográficos en isooctano. Finalmente, se introducen los viales en el cromatógrafo. El cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL utiliza una columna de diámetro interno de 0,2 mm. El gas portador es He a una presión de 250 kPa. La secuencia de temperaturas

3. Materiales y métodos

es la siguiente: 70 °C durante 2 minutos, incrementar a 160 °C manteniendo una velocidad de 30 °C min⁻¹, incrementar a 280 °C con una velocidad de 3 °C min⁻¹, mantener el flujo durante 15 minutos.

El cálculo para la concentración de cada ácido graso es como sigue:

$$\text{Para el blanco: } C(\text{nmol/g}) = \frac{(F_{FM} \times C_{IS} \times 2 \times 1000)}{P \times F_{IS} \times MG_{FM}}$$

$$\text{Para las muestras: } C(\text{nmol/g}) = \left(\frac{(F_{FM} \times C_{IS} \times 2 \times 1000)}{C_{BW} \times F_{IS} \times MG_{FM}} \right) \times \frac{100}{P}$$

donde:

C: concentración.

F_{FM}: área del pico en la muestra.

MG_{FM}: peso molecular del ácido graso que corresponde con el pico en la muestra.

C_{IS}: concentración del estándar interno expresada en µg.

F_{IS}: área del pico correspondiente al patrón estándar interno.

P = peso del suelo

2: factor de dilución al tomar sólo 3 ml de la fase orgánica sobre los 6 ml totales.

1000: factor de conversión de a nmol.

C_{BW}: concentración de ese ácido graso en el blanco calculado por la primera fórmula.

La diversidad de PLFAs mediante el índice de Shannon (HPLFA) se calcula del siguiente modo:

$$\text{HPLFA} = - \sum_{n=1}^{\infty} p_i \ln p_i$$

donde:

p_i : es la abundancia relativa de cada ácido graso con respecto a la suma total.

n : es el número total de ácidos grasos detectados.

Nomenclatura, clasificación de PLFAs y diversidad

La nomenclatura de los PLFA se designa atendiendo al esquema X: Y_Z, donde X se refiere al número de átomos de carbono, Y al número de dobles enlaces, y Z indica la posición del primer doble enlace desde el extremo alifático de la molécula. El símbolo ω expresa la posición del primer doble enlace desde el extremo metilo de la molécula. Los prefijos iso (*i*) y anteiso (*a*) indican ramificación en los átomos de C número 2 y 3, respectivamente. El prefijo cy indica presencia de un grupo ciclopropilo. La configuración cis o trans se expresa mediante los prefijos c o t respectivamente.

Los ácidos grasos i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1 ω 7c, 17:0, i17:0, cy17:0, 18:1 ω 9c, y cy19:0 representan biomasa bacteriana (Frostegard et al., 1993; Bardgett et al., 1996; Dungait et al., 2010) mientras que el ácido graso 18:2 ω 6 es exclusivo de hongos (Federle et al., 1986; Zelles et al., 1992; Bååth, 2003). Los ácidos grasos específicos de bacterias Gram positivas son los siguientes: i15:0, a15:0, i16:0, y i17:0; y los correspondientes a Gram negativas son cy17:0, 18:1 ω 9c, y cy19:0.

3.3.4. Determinación de plaguicidas en suelo

3.3.4.1. Determinación de oxifluorfen en suelo

La extracción de oxifluorfen se realizó siguiendo la metodología descrita por Anastassiades et al. (2003). Para ello, se utilizó una mezcla de trifenilfosfato y acetonitrilo para agitar el suelo. Una vez agitado y centrifugado, al sobrenadante se le añadió sulfato magnésico, se volvió a agitar y centrifugar. El sobrenadante se concentró y se recompuso el residuo seco con 1ml de ciclohexano:acetato de Etilo 9:1.

Oxifluorfen se determinó mediante un espectrómetro de masas en tándem e impacto electrónico, donde las condiciones cromatográficas fueron He como gas portador a 1ml/min; con temperatura inicial del inyector de 70°C durante 0,50 minutos y a 310 °C

a 100 °C/min durante 10 minutos. La columna utilizada tenía unas dimensiones 30 mm x 0,25mm. Las condiciones en las que se realizó la medida en el HPLC fueron: Temperatura inicial del horno de columna: 70 °C durante 3,5 min., 180 °C a 35 °C/min, 300 °C a 10 °C/min durante 5 min; Temperaturas del detector: Trampa a 250 °C, Colector a 60 °C, Xferline hasta 280 °C; Volumen de inyección: 5 µl.

3.3.4.2. Determinación de clorpirifos en suelo

La extracción de clorpirifos del suelo se realizó de acuerdo al método descrito por Menon et al. (2004). Según esta metodología, el clorpirifos se extrajo dos veces con una mezcla de acetona/metanol (1:1, v/v) durante 48 h. Después de la filtración, el filtrado se concentró hasta 2 ml y luego se diluyó a 25 ml con solución saturada de cloruro sódico. La fase acuosa se desechó después de extraer dos veces con 10 ml de diclorometano. Las fracciones de diclorometano reunidas se hicieron pasar a través de sulfato de sodio anhidro, se concentraron hasta 10 ml y se resuspendieron en 1 ml de metanol. Se cargaron 800µl de este extracto en cartuchos Sep-PakRp C18 (Millipore, Waters Chromatography), que se había preacondicionado en primer lugar con 8,5 ml de metanol y luego 8,5 ml de agua. El cartucho se lavó con una mezcla acetonitrilo/agua (9:10, v/v) y se secó. Posteriormente, se extrajo el analito con 1 ml de metanol.

Clorpirifos se midió usando un cromatógrafo HPLC Beckman, System Gold, Autosampler 508 equipado con un detector de UV fijado a 240 nm usando una columna C18, fase inversa (4,6 x 250 mm²) a 25 °C. Se utilizó una mezcla de hexano/diclorometano/metanol/2-propanol (80: 15: 0,2: 4,8) como fase móvil.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos llevados a cabo en los 3 trabajos publicados, se realizaron utilizando el paquete informático Statgraphics Plus 2.1 (Statistical Graphic Corporation).

Por una parte se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de dos direcciones, siendo el tratamiento realizado y el tiempo de muestreo las variables utilizadas en dicho análisis, realizándose la comparación múltiple de medias post-hoc mediante el test de

3. Materiales y métodos

Tukey en el caso de homogeneidad de las varianzas. Para el ANOVA, se utilizaron datos triplicados para cada tratamiento y para cada día de incubación.

4. RESULTADOS

4.1. PRIMERA EXPERIENCIA DE INCUBACIÓN

4.1.1. Humedad del suelo

La Figura 10 muestra la humedad del suelo para los tratamientos fertilizantes sometidos a sequía severa durante el periodo experimental. En los suelos no enmendados y sometidos a sequía severa, la humedad disminuyó significativamente ($p < 0,05$) durante todo el período de incubación, de tal forma que al final del período experimental, la humedad del suelo disminuye un 76,9%. Al aplicar materia orgánica al suelo no regado, la humedad sufrió una disminución menos drástica. Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos orgánicos. En este sentido, y al final del período de incubación, el mayor porcentaje de humedad se encontró en el suelo enmendado con SM, seguido por CM y MSW (30,1% y 47,4%), respectivamente.

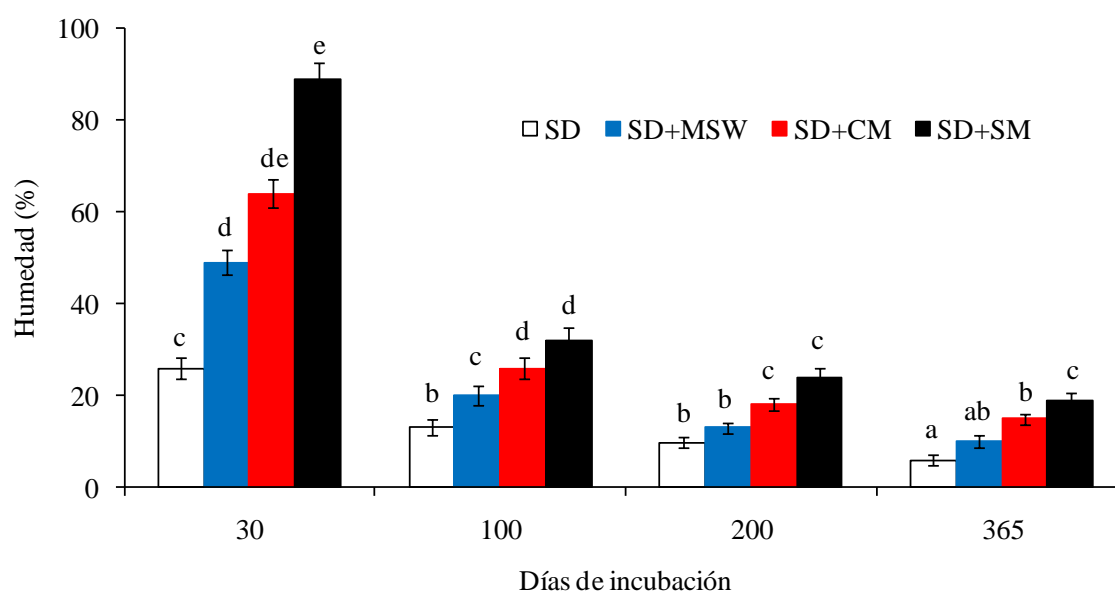


Figura 10. Evolución de la humedad (%) (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos no regados durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.1.2. Propiedades químicas del suelo

Como era de esperar, en los suelos regados la adición de enmiendas orgánicas aumentó el C soluble en agua (Tabla 8). Al final del período de incubación, este aumento en este parámetro químico fue significativamente mayor en el suelo enmendado con SM que en los suelos enmendados con CM (55,7%) y MSW (78,7%).

4. Resultados

Tabla 8. Evolución del Carbono soluble en agua ($\mu\text{g C g}^{-1}$) (media \pm error estándar, $n=3$) en suelos regados y no regados durante el periodo experimental. Los números en la fila seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

	Días de incubación			
	30	100	200	365
S	477a \pm 7	461a \pm 13	471a \pm 16	465a \pm 11
S+MSW	563a \pm 23	538a \pm 12	581ab \pm 19	596b \pm 15
S+CM	1282c \pm 73	1153c \pm 62	1048c \pm 58	1243c \pm 80
S+SM	2714d \pm 82	2636d \pm 118	2700d \pm 143	2804d \pm 82
SD	471a \pm 18	493a \pm 16	550a \pm 24	636b \pm 52
SD+MSW	532a \pm 20	649b \pm 64	734b \pm 54	803b \pm 83
SD+CM	1304c \pm 73	1432c \pm 83	1550c \pm 64	1711c \pm 101
SD+SM	2666d \pm 58	3235d \pm 117	3732de \pm 73	4094e \pm 122

En los suelos no regados, y a diferencia de los suelos regados, la concentración del C soluble en agua aumentó durante todo el periodo experimental. Lógicamente, este parámetro químico fue mayor en los suelos enmendados orgánicamente que con respecto al tratamiento SD. Comparado con el tratamiento SD y al final del período de incubación, el C soluble en agua fue un 84,5% mayor en el tratamiento SD + SM, 62,8% en el tratamiento SD + CM y 84,5% en el tratamiento SD + MSW.

La Tabla 9 muestra la evolución de la distribución del peso molecular de la proteína (kDa) para los días 30 y 365 del periodo experimental. En los suelos regados, la adición al suelo de las distintas enmiendas orgánicas, modificó la distribución del peso molecular de las proteínas, aumentando las proteínas con mayor peso molecular en los suelos enmendados con MSW, seguido por CM y SM. Al final del período experimental, el porcentaje de proteínas de mayor peso molecular disminuyó, aumentando el porcentaje de proteínas de menor peso molecular. En los suelos no regados y al final del experimento, el porcentaje de proteínas de alto peso molecular también disminuyó, pero esta disminución fue menor que en los suelos regados.

4. Resultados

Asimismo, el porcentaje de proteínas de bajo peso molecular también aumentó, pero nuevamente, este aumento fue menor que en los suelos regados.

Tabla 9. Evolución de la distribución del peso molecular de la proteína (kDa) (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados durante el periodo experimental. Los números en la fila seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

	Peso molecular (kDa)			
	> 50	50-30	30-10	< 10
S30	0a \pm 0	0a \pm 0	38,3f \pm 1,7	61,7g \pm 1,3
S+MSW30	2,6c \pm 0,5	24,4e \pm 1,5	31,9f \pm 2,3	41,1f \pm 1,6
S+CM30	1,1b \pm 0,2	16,6e \pm 2,1	34,7f \pm 2,8	47,6f \pm 2,6
S+SM30	0,7ab \pm 0,2	9,4d \pm 1,0	37,2f \pm 1,3	52,7f \pm 3,0
S365	0a \pm 0	0a \pm 0	41,2f \pm 2,0	58,8g \pm 2,1
S+MSW365	1,9b \pm 0,2	18,0e \pm 1,9	34,1f \pm 2,4	46,0f \pm 2,9
S+CM365	0,8ab \pm 0,1	10,1d \pm 1,4	37,5f \pm 2,6	51,6f \pm 3,0
S+SM365	0,2a \pm 0,1	6,3d \pm 0,9	39,0f \pm 3,3	54,5f \pm 2,4
SD30	0a \pm 0	0a \pm 0	37,9f \pm 1,3	62,1g \pm 2,1
SD+MSW30	2,7c \pm 0,6	24,4e \pm 1,6	32,6f \pm 2,1	40,3f \pm 1,8
SD+CM30	1,2b \pm 0,3	16,3e \pm 1,1	34,3f \pm 3,5	48,0f \pm 2,2
SD+SM30	0,7ab \pm 0,1	9,5d \pm 0,8	38,0f \pm 1,4	51,8f \pm 1,7
SD365	0a \pm 0	0a \pm 0	39,0f \pm 3,1	61,0g \pm 3,3
SD+MSW365	2,3c \pm 0,5	21,9e \pm 2,4	33,0f \pm 2,6	42,8f \pm 2,2
SD+CM365	1,0b \pm 0,2	15,0de \pm 1,1	35,2f \pm 1,5	48,8f \pm 1,6
SD+SM365	0,4a \pm 0,1	8,9d \pm 0,8	38,4f \pm 1,1	52,3f \pm 1,6

La Tabla 10 muestra la evolución del Carbono de ácidos fúlvicos y húmicos para todos los tratamientos realizados, en ambas condiciones de humedad y para los 365 días de incubación. En ambos estadios de humedad, la aplicación de materia orgánica al suelo aumentó la concentración del Carbono de ácidos húmicos y fúlvicos. En los suelos regados, la evolución del Carbono de ácidos fúlvicos fue muy similar a la del

4. Resultados

Carbono soluble en agua, presentando los mayores valores al final del periodo experimental en el suelo enmendado con SM, seguido de CM y MSW.

Respecto a la evolución del Carbono de ácidos húmicos, los resultados destacan que no hubo diferencias significativas en cuanto a la evolución de dicho parámetro en suelos regados y en suelos no regados (Tabla 10).

Tabla 10. Evolución del Carbono de ácidos fúlvicos y ácidos húmicos (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados durante el periodo experimental. Los números en la fila seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

	Días de incubación			
	30	100	200	365
C ácidos fúlvicos (mg C kg ⁻¹)				
S	2,9a \pm 0,2	2,9a \pm 0,4	3,0a \pm 0,4	2,9a \pm 0,4
S+MSW	4,1b \pm 0,5	4,2b \pm 0,7	4,1b \pm 0,8	4,3b \pm 0,8
S+CM	4,5b \pm 0,6	4,4b \pm 0,6	4,5b \pm 0,7	4,5b \pm 0,6
S+SM	9,4c \pm 0,2	9,3c \pm 0,9	9,5c \pm 1,0	10,4c \pm 1,1
SD	2,9a \pm 0,4	3,1a \pm 0,4	2,9a \pm 0,3	3,1a \pm 0,5
SD+MSW	4,1b \pm 0,6	4,0b \pm 0,6	4,1b \pm 0,5	4,1b \pm 0,5
SD+CM	4,5b \pm 0,6	4,6b \pm 0,7	4,6b \pm 0,5	4,5b \pm 0,4
SD+SM	9,3c \pm 0,8	9,2c \pm 0,9	9,3c \pm 1,1	9,4c \pm 1,3
C ácidos húmicos (mg C kg ⁻¹)				
S	3,2a \pm 0,6	3,2a \pm 0,4	3,2a \pm 0,4	3,2a \pm 0,5
S+MSW	4,6b \pm 0,4	4,6b \pm 0,3	4,6b \pm 0,3	4,6b \pm 0,3
S+CM	6,9c \pm 0,5	6,9c \pm 0,6	6,9c \pm 0,4	6,9c \pm 0,5
S+SM	9,4d \pm 0,4	9,4d \pm 0,4	9,4d \pm 0,4	9,3d \pm 0,4
SD	3,2a \pm 0,5	3,2a \pm 0,4	3,2a \pm 0,3	3,2a \pm 0,4
SD+MSW	4,6b \pm 0,5	4,6b \pm 0,4	4,6b \pm 0,5	4,6b \pm 0,5
SD+CM	6,9c \pm 0,6	6,9c \pm 0,5	6,9c \pm 0,4	6,9c \pm 0,5
SD+SM	9,3d \pm 0,5	9,4d \pm 0,5	9,3d \pm 0,4	9,4d \pm 0,4

En los suelos no regados, y comparado con el tratamiento S, el contenido del Carbono de ácidos fúlvicos al final del periodo experimental fue un 17,5% mayor en el tratamiento SD (Tabla 10). Respecto a los suelos enmendados orgánicamente, solo el tratamiento SD+SM fue significativamente ($p < 0,05$) mayor con respecto al tratamiento S+SM.

Los espectros obtenidos en el análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{13}C de estado sólido para los días 30 y 365, se muestran en la Tabla 11. En suelos regados y para todos los tratamientos, la región de desplazamiento químico correspondiente a CO-alquilo es la dominante, tanto en el día 30 como en el día 365, representando aproximadamente el 35-40% de la intensidad total de la señal. Las resonancias en las regiones aromáticas C (110-165 ppm) y alquilo C (0-45 ppm), contribuyen 10-16% y 26-30% de la intensidad total, respectivamente. Además, se observó una disminución en el contenido del CO-alquilo y un aumento en C alquilo, C aromático y C carboxílico durante todo el período experimental, independientemente del tipo de residuo orgánico aplicado al suelo. Comparado con el suelo sin enmendar, la relación C alquilo/C O-alquilo (A/O-A) aumentó al final del periodo experimental en los suelos enmendados orgánicamente. En los suelos no regados, los espectros de revelaron que la región C O-alquilo es la dominante (35-44%) al principio y al final del período experimental, seguido por el C alquilo (24-30 %) y el C aromático (10-16%). En los suelos no regados y al final del período experimental, el C O-alquilo C aumentó, mientras que la relación C alquilo/C O-alquilo (A/O-A) disminuyó a través del experimento.

Tabla 11. Evolución de los picos de RMN de ^{13}C en estado sólido y relación C alquilo/C O-alquilo (A/O-A) en los tratamientos fertilizantes a los 30 y 365 días de iniciado el experimento.

	S	S+MSW	S+CM	S+SM	SD	SD+MSW	SD+CM	SD+SM
<u>C alquilo</u>								
30 días	29,0	28,4	26,2	29,7	30,2	28,1	27,9	27,9
365 días	30,8	29,2	28,1	31,6	30,1	28,4	26,5	24,3
<u>C O-alquilo</u>								
30 días	38,2	36,8	42,9	41,7	35,6	38,8	40,8	44,4
365 días	37,9	35,5	36,7	37,0	35,7	37,2	41,4	48,3
<u>C aromático</u>								
30 días	13,9	16,3	12,7	10,3	15,1	15,0	12,6	10,0
365 días	12,6	16,2	15,4	11,9	15,8	16,8	13,8	11,8
<u>C carboxílico</u>								
30 días	6,7	7,3	7,0	7,7	7,6	6,6	7,7	6,6
365 días	6,8	8,3	8,1	7,2	7,5	6,8	7,3	6,0
<u>relación A/O-A</u>								
30 días	0,76	0,77	0,61	0,71	0,85	0,73	0,69	0,63
365 días	0,81	0,82	0,76	0,86	0,84	0,76	0,64	0,50

4.1.3. Propiedades bioquímicas del suelo

La Figura 11 muestra la evolución del C de la biomasa microbiana del suelo para todos los tratamientos fertilizantes durante el periodo experimental. En los suelos regados, la aplicación de materia orgánica al suelo aumentó significativamente ($p < 0,05$) el C de la biomasa microbiana. Este aumento dependió de la composición química del residuo orgánico aplicado. En este sentido, y al final del período experimental, el C de la biomasa microbiana fue mayor en el suelo enmendado con SM que en los suelos enmendados con CM y MSW (9,9% y 23,1%, respectivamente). En los suelos no regados, el C de la biomasa microbiana disminuyó significativamente ($p < 0,05$) durante el periodo experimental. Este descenso fue mayor en el suelo no enmendado que en el suelo enmendado con las distintas formas orgánicas experimentales. Del mismo modo, la distinta composición química de los residuos orgánicos empleados influyó en este descenso del C de la biomasa microbiana. Así, coincidiendo con los datos de humedad encontrados, el C de la biomasa microbiana fue mayor en el tratamiento SD+SM, seguido de los tratamientos SD+CM y SD+MSW.

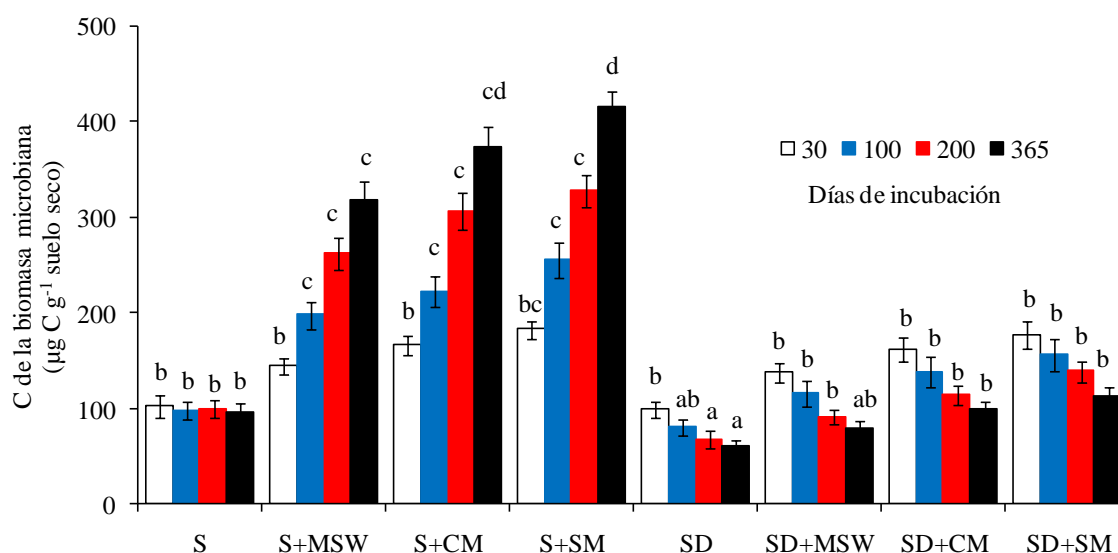


Figura 11. Evolución del C de la biomasa microbiana (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

La Figura 12 muestra la evolución de la actividad deshidrogenasa para todos los tratamientos fertilizantes durante el periodo experimental. En suelos regados, y al igual

que para el C de la biomasa microbiana, la actividad deshidrogenasa aumentó progresivamente durante todo el periodo de incubación. Sin embargo, este aumento también dependió del tipo de materia orgánica aplicada al suelo. Comparado con el tratamiento S, y al final del periodo de incubación, la actividad deshidrogenasa aumentó un 93,4% en el tratamiento S+SM, un 91,3% en el tratamiento S+CM y un 88% en el tratamiento S+MSW.

A diferencia de los suelos regados, en los suelos no regados la actividad deshidrogenasa disminuyó de forma progresiva durante todo el periodo de incubación. Este descenso fue mayor en el suelo no enmendado que con respecto a los suelos enmendados orgánicamente. También se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos orgánicos empleados. De esta forma, comparado con el tratamiento SD y al final del periodo de incubación, la actividad deshidrogenasa aumentó un 71,3% en el tratamiento S+SM, un 60,9% en el tratamiento S+CM y un 38,6% en el tratamiento S+MSW.

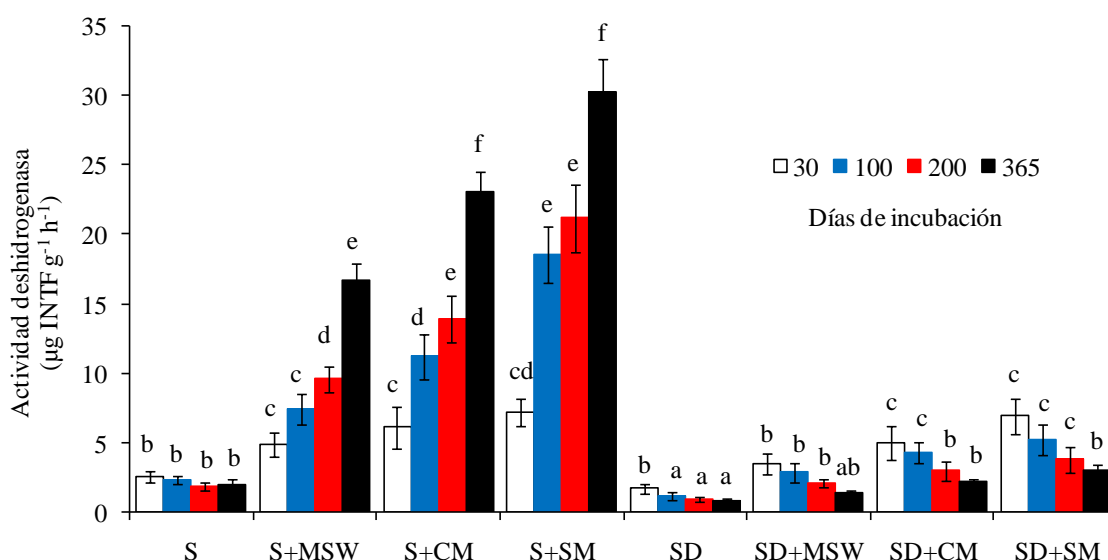


Figura 12. Evolución de la actividad deshidrogenasa (media \pm error estándar, $n = 3$) en no regados durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$). INTF: 2-*p*-iodo-3-nitrophenyl formazan

La evolución de la actividad ureasa fue muy similar a la de la actividad deshidrogenasa (Figura 13).

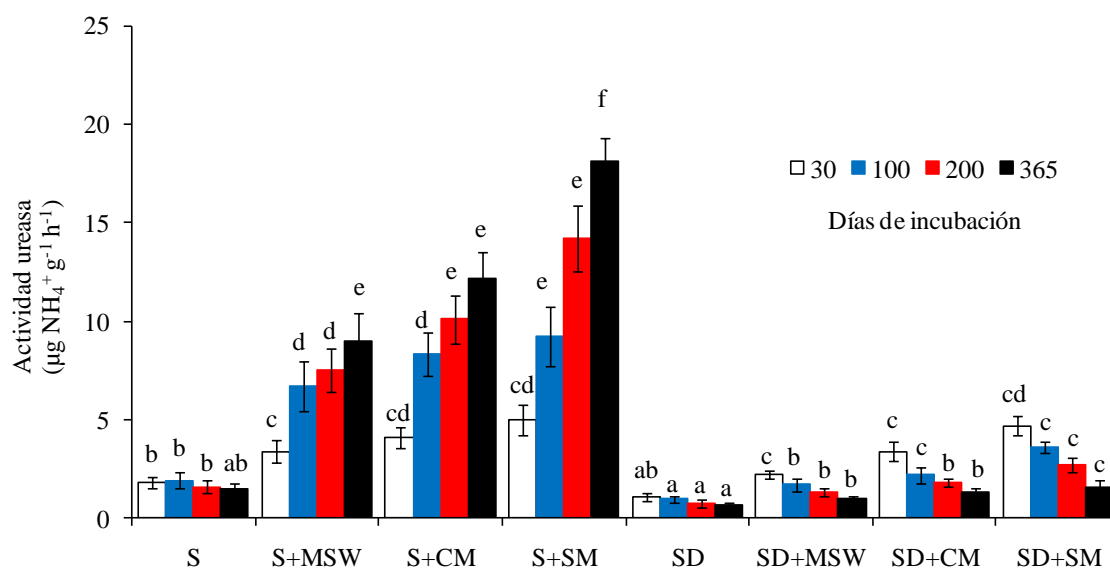


Figura 13. Evolución de la actividad ureasa (media \pm error estándar, $n = 3$) en no regados durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

En los suelos húmedos, la actividad ureasa significativamente ($p < 0,05$) aumentó en los suelos enmendados con materia orgánica. De nuevo, esta actividad enzimática fue diferente dependiendo del tipo de residuo orgánico aplicado al suelo. En este sentido, comparado con el tratamiento S y al final del periodo de incubación, la actividad ureasa aumentó un 91,7% en el tratamiento S+SM, un 87,7% en el tratamiento S+CM y un 83,3% en el tratamiento S+MSW.

Comparado con los suelos regados, en los suelos no regados la actividad ureasa disminuyó. Sin embargo, este descenso fue menor en los suelos enmendados orgánicamente que en los suelos no enmendados. Al igual que en la actividad deshidrogenasa, en la actividad ureasa también se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos orgánicos empleados. De esta forma, comparado con el tratamiento SD y al final del periodo de incubación, la actividad deshidrogenasa aumentó un 60,6% en el tratamiento SD+SM, un 51,5% en el tratamiento SD+CM y un 37% en el tratamiento SD+MSW.

Las Figuras 14 a 16 muestran la evolución de las actividades β -glucosidasa, fosfatasa y *o*-difenoloxidasa para los suelos regados y no regados durante todo el periodo de incubación. Al igual que para el C de la biomasa microbiana y actividades deshidrogenasa y ureasa anteriormente comentadas, en suelos regados, la aplicación de materia orgánica estimuló significativamente ($p < 0,05$) estas actividades enzimáticas.

También, esta estimulación dependió del tipo de materia orgánica, destacándose en todos los casos una mayor estimulación en el suelo enmendado con SM, seguido de CM y MSW.

En suelos no regados, y comparado con los suelos regados, las actividades β -glucosidasa, fosfatasa y *o*-difenoloxidasa disminuyeron. También, este descenso fue menor en los suelos enmendados orgánicamente que en los suelos no enmendados. Al igual que en los otros parámetros bioquímicos determinados, a actividad deshidrogenasa, en las actividades β -glucosidasa, fosfatasa y *o*-difenoloxidasa también se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos orgánicos empleados, observándose los mayores valores en el tratamiento SD+SM, seguido de los tratamientos SD+CM y SD+MSW.

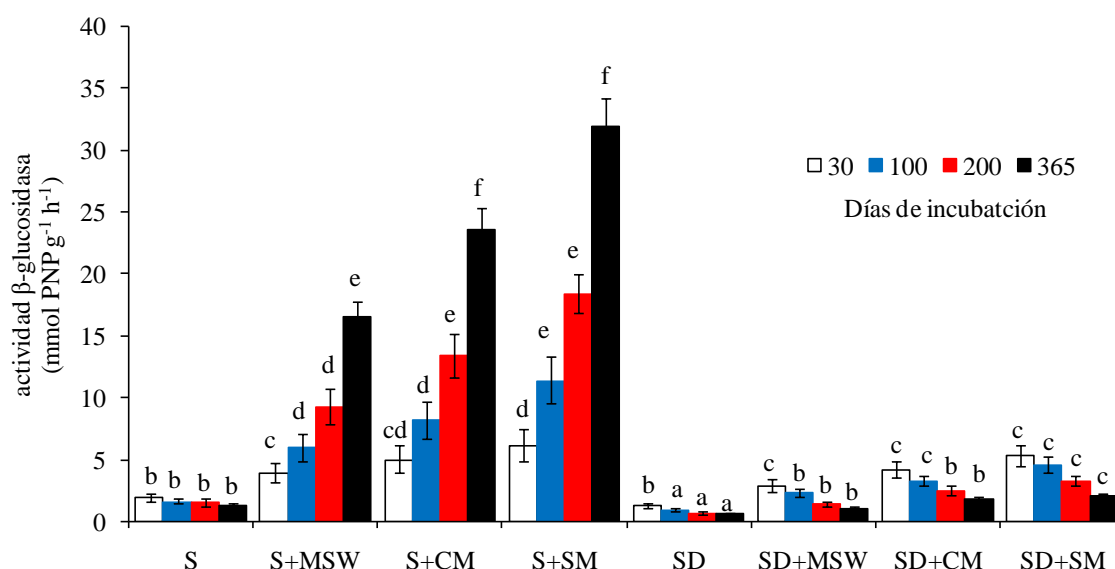


Figura 14. Evolución de la actividad β -glucosidasa (media \pm error estándar, $n = 3$) en no regados durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$). PNP: *p*-nitrofenol

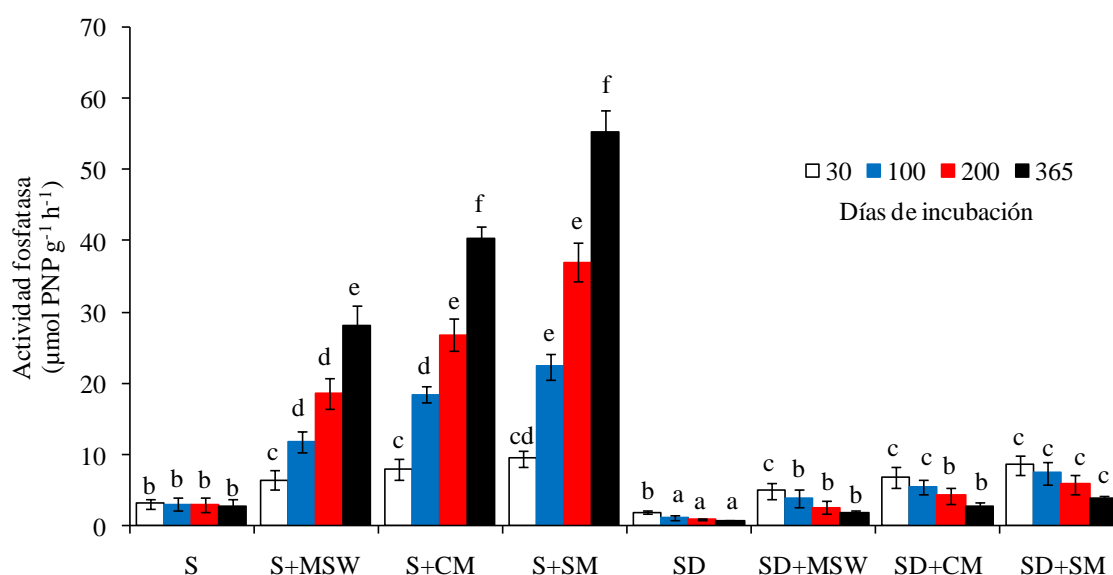


Figura 15. Evolución de la actividad fosfatasa (media \pm error estándar, $n = 3$) en no regados durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$). PNP: *p*-nitrofenol

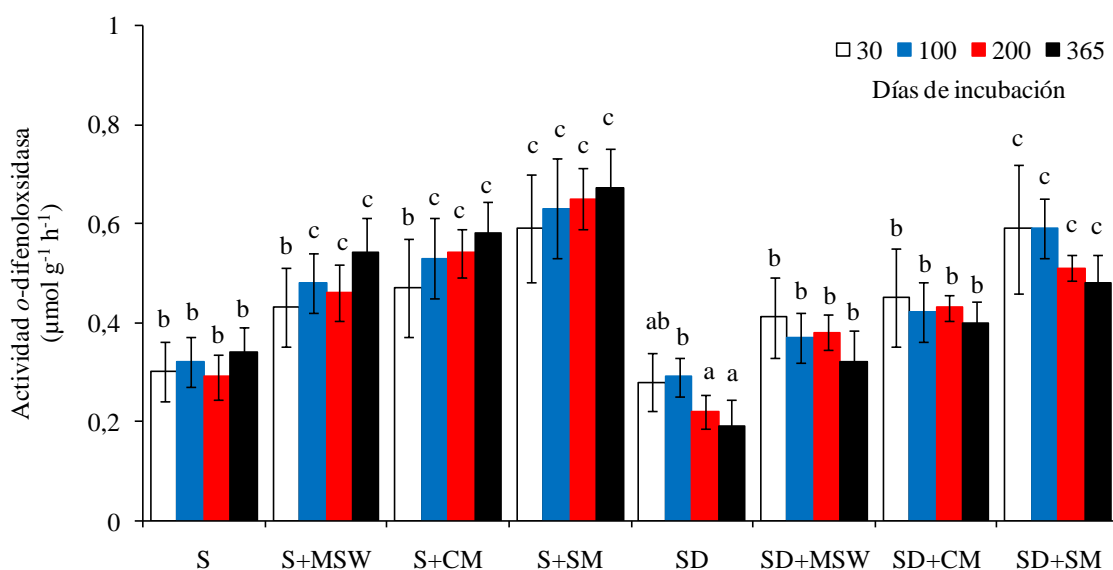


Figura 16. Evolución de la actividad *o*-difenoloxidas (media \pm error estándar, $n = 3$) en no regados durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.1.4. Biodiversidad microbiana del suelo

La tabla 11 muestra la evolución de la comunidad microbiana (bacterias y hongos) para los tratamientos fertilizantes experimentales a los 30 y 365 días de iniciado el periodo de incubación.

4. Resultados

Tabla 12. Evolución de bacterias Gram⁺, Gram⁻, bacterias totales PLFAs y hongos PLFAs (ng g⁻¹) (media \pm error estándar, n = 3) en los tratamientos fertilizantes a los 30 y 365 días de iniciado el experimento Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas (p>0,05).

	bacGram ⁺	bacGram ⁻	Bacterias totales PLFAs	Hongos PLFAs
S30	687a \pm 31	411b \pm 28	1098b \pm 63	32,3b \pm 3,8
S+MSW30	769b \pm 36	512c \pm 33	1281c \pm 66	40,8c \pm 4,4
S+CM30	798b \pm 49	559c \pm 40	1357c \pm 83	46,2c \pm 4,1
S+SM30	810b \pm 38	597c \pm 28	1407c \pm 64	50,4c \pm 4,9
S365	579a \pm 26	378a \pm 30	957b \pm 59	34,8b \pm 2,8
S+MSW365	1938c \pm 47	806d \pm 35	2744d \pm 94	69,5c \pm 4,1
S+CM365	2641c \pm 85	933d \pm 40	3574d \pm 119	71,7c \pm 3,6
S+SM365	3394d \pm 74	1275e \pm 33	4669e \pm 101	85,8d \pm 5,2
SD30	657a \pm 30	339a \pm 28	996b \pm 55	26,1a \pm 3,3
SD+MSW30	748b \pm 28	438c \pm 31	1186b \pm 55	33,6b \pm 3,0
SD+CM30	785b \pm 58	462c \pm 37	1247b \pm 81	37,4c \pm 2,4
SD+SM30	801b \pm 39	477c \pm 44	1278c \pm 85	40,1c \pm 4,5
SD365	470a \pm 44	235a \pm 20	705a \pm 62	22,1a \pm 3,9
SD+MSW365	505a \pm 18	389b \pm 27	894b \pm 46	30,1b \pm 8,0
SD+CM365	523a \pm 25	402b \pm 36	925b \pm 58	33,9b \pm 8,3
SD+SM365	549a \pm 20	433c \pm 22	982b \pm 44	37,2c \pm 7,6

En los suelos regados periódicamente durante el periodo experimental, la aplicación de materia orgánica también causó un aumento significativo (p<0,05) en las concentraciones totales de bacterias y hongos en el suelo. De forma similar a las actividades enzimáticas, al final de la incubación experimental, el aumento de bacterias Gram⁺, bacterias Gram⁻, bacterias totales PLFAs y hongos PLFAs fúngico fue mayor en suelos enmendados con SM, seguido por CM y MSW,. En este sentido, las bacterias totales fueron un 23,5% mayor en los suelos enmendados con SM que con CM y un 41,2% más alto en los suelos enmendados con SM que en los enmendados con MSW. Respecto a los hongos totales, estos fueron un 16,4% mayor en los suelos enmendados

con SM que con CM y un 19% mayor en los suelos enmendados con SM que con MSW.

A diferencia de los suelos regados, en los suelos no regados y sometidos a sequía severa, la evolución de las bacterias y hongos totales fue muy diferente. En este sentido, al final del periodo experimental de un año, las poblaciones de bacterias y hongos disminuyeron progresivamente a lo largo de dicho periodo experimental, presentando valores significativamente ($p<0,05$) inferiores a los obtenidos para los suelos regados. . Al igual que las actividades enzimáticas estudiadas, cuando se aplicó materia orgánica a los suelos no regados, tanto la población bacteriana como fúngica de los suelos mostraron un descenso menos pronunciado. Del mismo modo, la evolución de la comunidad bacteriana y fúngica estuvo también influenciada por el tipo de materia orgánica aplicada al suelo, destacando una menor disminución de la población microbiana en el suelo enmendado con SM, seguida por CM y MSW.

4.2. SEGUNDA EXPERIENCIA DE INCUBACIÓN

4.2.1. Humedad del suelo

La Figura 17 muestra la humedad del suelo para los suelos no regados en presencia del herbicida oxifluorfen (A) y del insecticida clorpirifos (B) durante el periodo de incubación de 120 días. La evolución de dicha humedad es muy similar en ambos casos, destacando una disminución significativa ($p<0,05$) de la humedad en los suelos al final del periodo experimental.

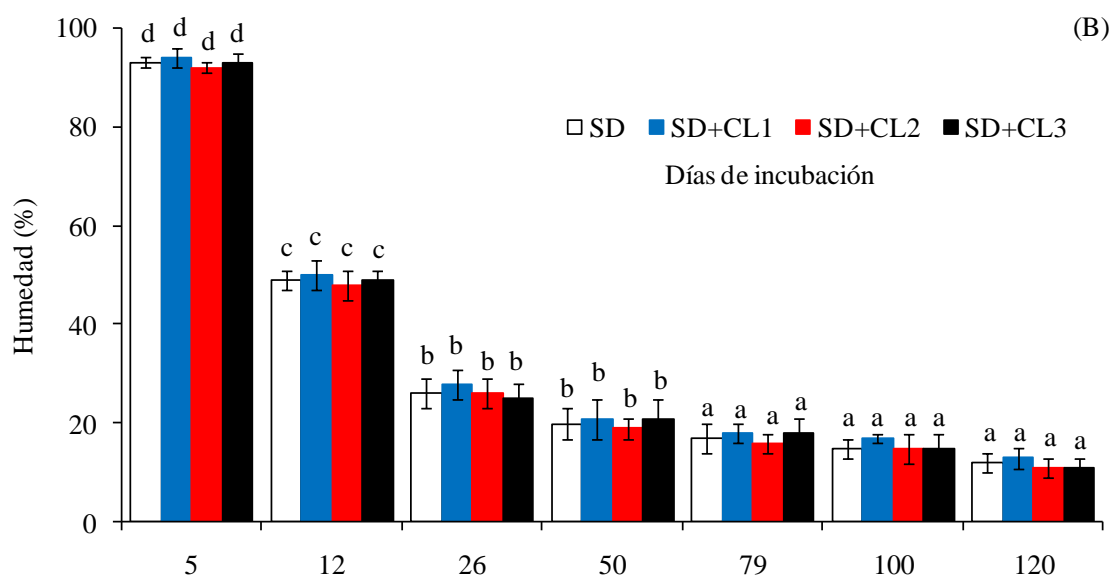


Figura 17. Evolución de la humedad (%) (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos no regados y con oxifluorfen (A) y clorpirifos (B) durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.2.2. Propiedades bioquímicas del suelo

La aplicación de oxifluorfen a los suelos regados periódicamente durante los 120 días de incubación, ocasionó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la actividad de la deshidrogenasa durante todo el período experimental (Tabla 12). Esta disminución fue mayor cuando se aplicó la mayor dosis de herbicida al suelo (8 l ha^{-1}). Esta inhibición enzimática fue máxima al día 26 después de iniciar el proceso de incubación.

Tabla 13. Evolución de la actividad deshidrogenasa ($\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$) (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados en presencia de oxifluorfen y clorpirifos durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$). INTF: 2-*p*-iodo-3-nitrophenyl formazan

	5	12	26	50	79	100	120
	Oxifluorfen (mg kg^{-1})						
S	2,5c \pm 0,4	2,6c \pm 0,5	2,3c \pm 0,2	2,3c \pm 0,3	2,1c \pm 0,4	2,2c \pm 0,4	2,3c \pm 0,5
S+O1	1,1b \pm 0,2	1,1b \pm 0,2	1,0b \pm 0,2	1,2b \pm 0,2	1,4b \pm 0,3	1,6b \pm 0,3	1,8b \pm 0,4
S+O2	1,6b \pm 0,2	1,4b \pm 0,3	1,3b \pm 0,3	1,4b \pm 0,3	1,6b \pm 0,4	1,8b \pm 0,2	2,0bc \pm 0,4
S+O3	0,52a \pm 0,09	0,50a \pm 0,11	0,43a \pm 0,11	0,64a \pm 0,08	0,78b \pm 0,10	0,89b \pm 0,08	1,2b \pm 0,2
SD	2,1c \pm 0,3	1,8b \pm 0,3	1,7b \pm 0,1	1,5b \pm 0,2	1,4b \pm 0,2	1,2b \pm 0,10	1,1b \pm 0,2
SD+O1	1,1b \pm 0,2	0,95b \pm 0,09	0,82b \pm 0,12	0,75a \pm 0,07	0,77a \pm 0,09	0,70a \pm 0,05	0,73a \pm 0,08
SD+O2	1,5b \pm 0,3	1,2b \pm 0,2	1,0b \pm 0,1	0,96b \pm 0,10	0,90b \pm 0,07	0,95b \pm 0,05	1,1b \pm 0,1
SD+O3	0,63a \pm 0,08	0,51a \pm 0,08	0,40a \pm 0,05	0,33a \pm 0,04	0,42a \pm 0,05	0,35a \pm 0,03	0,40a \pm 0,03
	Clorpirifos (mg kg^{-1})						
S	2,5c \pm 0,4	2,5c \pm 0,5	2,3c \pm 0,3	2,3c \pm 0,3	2,1c \pm 0,4	2,2c \pm 0,4	2,3c \pm 0,5
S+CL1	1,5b \pm 0,2	1,1b \pm 0,1	1,3b \pm 0,2	1,6b \pm 0,2	1,8b \pm 0,3	2,0c \pm 0,4	2,4c \pm 0,3
S+CL2	1,9b \pm 0,3	1,5b \pm 0,2	1,5b \pm 0,2	1,8b \pm 0,3	2,0c \pm 0,4	2,3c \pm 0,5	2,4c \pm 0,5
S+CL3	0,83a \pm 0,11	0,55a \pm 0,04	0,78a \pm 0,08	1,1b \pm 0,1	1,4b \pm 0,3	1,7b \pm 0,3	2,0c \pm 0,4
SD	2,1c \pm 0,3	1,8b \pm 0,3	1,7b \pm 0,1	1,5b \pm 0,2	1,4b \pm 0,2	1,2b \pm 0,10	1,1b \pm 0,2
SD+CL1	1,4b \pm 0,3	0,91a \pm 0,10	0,83a \pm 0,09	0,82a \pm 0,06	0,90a \pm 0,07	0,84a \pm 0,10	0,95ab \pm 0,08
SD+CL2	1,9b \pm 0,2	1,2b \pm 0,2	0,95ab \pm 0,09	0,93ab \pm 0,09	0,93ab \pm 0,10	0,96ab \pm 0,07	1,1b \pm 0,3
SD+CL3	0,85a \pm 0,14	0,57a \pm 0,07	0,47a \pm 0,05	0,42a \pm 0,06	0,57a \pm 0,05	0,66a \pm 0,08	0,78a \pm 0,10

A partir del día 26 desde el inicio de la incubación, la inhibición de la enzima disminuyó progresivamente hasta el final del período experimental. Al final de dicho período de incubación, y comparando el control con el tratamiento, la actividad deshidrogenasa disminuyó significativamente ($p < 0,05$) en un 21,7% y 47,8% sólo para los tratamientos S+O1 y S+O3, respectivamente. Aunque los valores obtenidos para el tratamiento S+O2 fueron también un 13% inferiores a los obtenidos para el tratamiento S, el análisis estadístico indicó que no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos.

Con respecto a los resultados obtenidos con el insecticida clorpirifos, la actividad deshidrogenasa también mostró una disminución significativa ($p < 0,05$). Una vez más, esta disminución fue mayor cuando se aplicó la mayor dosis de insecticida al suelo (10 l ha^{-1}). Esta disminución fue máxima a los 12 días después de aplicar el insecticida al suelo (40%, 56% y 78% para los tratamientos S+CL2, S+CL1 y S+CL3, respectivamente, en comparación con el tratamiento de control). A partir de esta fecha, esta disminución disminuyó hasta el final el período experimental, observándose una disminución significativa ($p < 0,05$) de la actividad de la deshidrogenasa hasta el día 79 después de la aplicación del clorpirifos en el suelo. Al final del período experimental, la actividad de la deshidrogenasa en los tratamientos S+CL2, S+CL1 y S+CL3 fue similar al tratamiento con S.

A diferencia de los suelos regados periódicamente, cuando se aplicó el herbicida oxifluorfen los suelos no regados, la actividad deshidrogenasa presentó menores valores al final de los 120 días de incubación. En este sentido, al final del período experimental y en comparación con los tratamientos S+O1, S+O2 y S+O3, la actividad deshidrogenasa disminuyó en un 54,3%, 42,1% y 69,2% para los tratamientos SD+O1, SD+O2 y SD+O3, respectivamente. Del mismo modo, tras la aplicación de clorpirifos en los suelos no regados se observó un descenso de la actividad deshidrogenasa durante el período experimental. De nuevo, este descenso fue mayor en los suelos con una mayor dosis de clorpirifos. Al igual que en el caso del suelo con oxifluorfen, los valores de la actividad deshidrogenasa fueron menores en suelos no regados que en suelos regados.

Al igual que ocurre con la actividad deshidrogenasa, cuando se aplicó el herbicida oxifluorfen en los suelos regados, la actividad ureasa disminuyó significativamente ($p < 0,05$) y de forma progresiva durante el período de incubación

(Tabla 13). De nuevo, este descenso en esta actividad enzimática fue máximo a los 26 días de iniciado el proceso de incubación.

Al final del periodo experimental, y comparando con el tratamiento control, la actividad ureasa significativamente ($p < 0,05$) disminuyó un 47,1%, 55,4% y 75,3% en los tratamientos S+O2, S+O1 y S+O3, respectivamente.

Cuando se aplicó clorpirifos al suelo regado periódicamente, también se produjo una inhibición significativa ($p < 0,05$) de dicha actividad ureasa, siendo máxima esta inhibición a los 26 días de iniciado el experimento. Al final de los 120 días experimentales, la actividad ureasa presentó unos valores muy similares en todos los tratamientos (S, S+CL1, S+CL2 y S+CL3, respectivamente).

La aplicación del herbicida en el suelo no regado también produjo una fuerte inhibición en la actividad ureasa (Tabla 13). Al final del periodo experimental y comparado con el tratamiento SD, la actividad ureasa significativamente ($p < 0,05$) disminuyó un 25,6% para el tratamiento SD+O2, seguido de un 36,7% y 53,3% para los tratamientos SD+O1 y SD+O3, respectivamente.

De la misma forma, cuando el insecticida clorpirifos se aplicó al suelo, se observó un descenso significativo ($p < 0,05$) en la actividad ureasa del suelo no regado periódicamente. En este sentido, al final del periodo experimental y comparado con el tratamiento SD, la actividad ureasa disminuyó un 27,8% en el tratamiento SD+O2, seguido de un 37,8% y 45,6% para los tratamientos SD+O1 y SD+O3, respectivamente.

Las Tablas 14 y 15 muestran la evolución de las actividades β -glucosidasa y fosfatasa para todos los tratamientos durante los 120 días de incubación. En los suelos regados, la respuesta de estas actividades enzimáticas fue muy similar a la descrita anteriormente cuando se aplicó oxifluorfen y clorpirifos al suelo. En este sentido, se observa una inhibición de las actividades β -glucosidasa y fosfatasa durante todo el periodo experimental cuando se aplicó el herbicida al suelo, mientras que cuando se aplicó clorpirifos al suelo, estas actividades enzimáticas mostraron un máximo de inhibición a los 12 días de iniciado el experimento.

Por último, cuando el suelo fue sometido a sequía severa durante los 120 días de incubación, las actividades β -glucosidasa y fosfatasa mostraron una evolución muy similar al comportamiento obtenido con las actividades deshidrogenasa y ureasa en suelos con los plaguicidas experimentales.

Tabla 14. Evolución de la actividad ureasa ($\mu\text{g NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$) (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados en presencia de oxifluorfen y clorpirifos durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

	5	12	26	50	79	100	120
Oxyfluorfen (mg kg^{-1})							
S	1,9c \pm 0,2	1,7c \pm 0,3	1,7c \pm 0,2	1,6c \pm 0,3	1,6c \pm 0,3	1,7c \pm 0,3	1,6c \pm 0,2
S+O1	0,90b \pm 0,11	0,82b \pm 0,09	0,75b \pm 0,07	0,80b \pm 0,06	0,89b \pm 0,08	0,93b \pm 0,08	1,0b \pm 0,1
S+O2	1,1b \pm 0,1	0,98b \pm 0,12	0,90 \pm 0,06	0,99b \pm 0,07	1,1b \pm 0,1	1,2b \pm 0,2	1,3bc \pm 0,1
S+O3	0,51a \pm 0,07	0,47a \pm 0,09	0,42a \pm 0,06	0,57a \pm 0,07	0,65b \pm 0,05	0,73b \pm 0,07	0,85b \pm 0,06
SD	1,8c \pm 0,3	1,5c \pm 0,2	1,3b \pm 0,2	1,2b \pm 0,1	1,0b \pm 0,1	0,98b \pm 0,09	0,90b \pm 0,09
SD+O1	0,88b \pm 0,10	0,74b \pm 0,07	0,62b \pm 0,09	0,58b \pm 0,06	0,60b \pm 0,06	0,53a \pm 0,06	0,57a \pm 0,06
SD+O2	1,0b \pm 0,2	0,96b \pm 0,10	0,81b \pm 0,08	0,79b \pm 0,08	0,72b \pm 0,09	0,77b \pm 0,05	0,73b \pm 0,09
SD+O3	0,50a \pm 0,07	0,41a \pm 0,06	0,33a \pm 0,05	0,29a \pm 0,04	0,37a \pm 0,04	0,39b \pm 0,04	0,42a \pm 0,04
Clorpirifos (mg kg^{-1})							
S	1,9c \pm 0,2	1,7c \pm 0,3	1,7c \pm 0,2	1,6c \pm 0,3	1,6c \pm 0,3	1,7c \pm 0,3	1,6c \pm 0,2
S+CL1	0,86b \pm 0,07	0,63b \pm 0,11	0,64b \pm 0,08	0,79b \pm 0,07	0,94b \pm 0,10	1,4c \pm 0,3	1,8c \pm 0,2
S+CL2	1,0b \pm 0,1	0,90b \pm 0,10	0,86b \pm 0,09	0,98b \pm 0,11	1,4c \pm 0,2	1,8c \pm 0,3	1,7c \pm 0,3
S+CL3	0,40a \pm 0,09	0,28a \pm 0,07	0,35a \pm 0,06	0,67b \pm 0,09	0,84b \pm 0,11	0,89b \pm 0,07	1,4c \pm 0,3
SD	1,8c \pm 0,3	1,5c \pm 0,2	1,3b \pm 0,2	1,2b \pm 0,1	1,0b \pm 0,1	0,98b \pm 0,09	0,90b \pm 0,09
SD+CL1	0,82b \pm 0,6	0,50a \pm 0,06	0,42a \pm 0,09	0,44a \pm 0,07	0,53a \pm 0,09	0,42a \pm 0,06	0,56a \pm 0,06
SD+CL2	0,94b \pm 0,10	0,68b \pm 0,09	0,55a \pm 0,06	0,58b \pm 0,09	0,62b \pm 0,10	0,70b \pm 0,05	0,65b \pm 0,08
SD+CL3	0,46a \pm 0,08	0,35a \pm 0,07	0,26a \pm 0,07	0,27a \pm 0,05	0,33a \pm 0,08	0,41a \pm 0,06	0,49a \pm 0,05

Tabla 15. Evolución de la actividad β -glucosidasa ($\text{mmol PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$) (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados en presencia de oxifluorfen y clorpirifos durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$). PNP: *p*-nitrofenol

	5	12	26	50	79	100	120
	Oxyfluorfen (mg kg^{-1})						
S	1,3c \pm 0,2	1,4c \pm 0,2	1,3c \pm 0,3	1,2c \pm 0,3	1,3c \pm 0,2	1,2c \pm 0,3	1,3c \pm 0,2
S+O1	0,54b \pm 0,09	0,49b \pm 0,07	0,40b \pm 0,05	0,51b \pm 0,07	0,60b \pm 0,04	0,59b \pm 0,05	0,62b \pm 0,05
S+O2	0,71b \pm 0,07	0,68c \pm 0,09	0,60b \pm 0,07	0,64b \pm 0,04	0,73bc \pm 0,05	0,84b \pm 0,05	0,95bc \pm 0,07
S+O3	0,28a \pm 0,03	0,23a \pm 0,02	0,18a \pm 0,05	0,26a \pm 0,04	0,34b \pm 0,03	0,40b \pm 0,07	0,47b \pm 0,05
SD	1,1c \pm 0,1	0,95c \pm 0,10	0,88c \pm 0,07	0,78bc \pm 0,10	0,71b \pm 0,08	0,63b \pm 0,06	0,61b \pm 0,08
SD+O1	0,51b \pm 0,08	0,46b \pm 0,09	0,39b \pm 0,09	0,38b \pm 0,07	0,41b \pm 0,08	0,39b \pm 0,06	0,43b \pm 0,05
SD+O2	0,68b \pm 0,09	0,57b \pm 0,10	0,49b \pm 0,06	0,46b \pm 0,06	0,44b \pm 0,04	0,48b \pm 0,07	0,50b \pm 0,07
SD+O3	0,25a \pm 0,06	0,19a \pm 0,04	0,13a \pm 0,03	0,11a \pm 0,03	0,15a \pm 0,04	0,17a \pm 0,04	0,20a \pm 0,03
	Clorpirifos (mg kg^{-1})						
S	1,3c \pm 0,2	1,4c \pm 0,2	1,3c \pm 0,3	1,2c \pm 0,3	1,3c \pm 0,2	1,2c \pm 0,3	1,3c \pm 0,2
S+CL1	0,75b \pm 0,06	0,49b \pm 0,05	0,51b \pm 0,03	0,72 \pm 0,04	0,82 \pm 0,07	1,1c \pm 0,3	1,2c \pm 0,2
S+CL2	0,89b \pm 0,05	0,77b \pm 0,06	0,80b \pm 0,07	0,90b \pm 0,06	1,0c \pm 0,1	1,2c \pm 0,1	1,2c \pm 0,1
S+CL3	0,39a \pm 0,04	0,23a \pm 0,03	0,33a \pm 0,03	0,62b \pm 0,08	0,87b \pm 0,09	1,0c \pm 0,1	1,3c \pm 0,2
SD	1,1c \pm 0,1	0,95c \pm 0,10	0,88b \pm 0,07	0,78b \pm 0,10	0,71b \pm 0,08	0,63b \pm 0,06	0,61b \pm 0,08
SD+CL1	0,73b \pm 0,10	0,48b \pm 0,08	0,40a \pm 0,05	0,37a \pm 0,05	0,46b \pm 0,09	0,43b \pm 0,05	0,50b \pm 0,09
SD+CL2	0,86b \pm 0,09	0,56b \pm 0,09	0,49b \pm 0,07	0,54b \pm 0,07	0,58b \pm 0,06	0,57b \pm 0,05	0,67b \pm 0,07
SD+CL3	0,35a \pm 0,05	0,26a \pm 0,04	0,20a \pm 0,04	0,16a \pm 0,03	0,24a \pm 0,08	0,30a \pm 0,03	0,37a \pm 0,07

Tabla 16. Evolución de la actividad fosfatasa ($\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$) (media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados en presencia de oxifluorfen y clorpirifos durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$). PNP: *p*-nitrofenol

	5	12	26	50	79	100	120
Oxyfluorfen (mg kg^{-1})							
S	3,2c \pm 0,9	3,3c \pm 0,7	3,1c \pm 0,7	3,1c \pm 0,6	3,3c \pm 0,5	3,1c \pm 0,6	3,0c \pm 0,8
S+O1	1,8b \pm 0,4	1,5b \pm 0,3	1,2b \pm 0,3	1,4b \pm 0,2	1,6b \pm 0,3	1,6b \pm 0,3	1,9b \pm 0,4
S+O2	2,6c \pm 0,3	2,5b \pm 0,6	2,2b \pm 0,6	2,4b \pm 0,4	2,4b \pm 0,3	2,6b \pm 0,5	2,8bc \pm 0,4
S+O3	0,89a \pm 0,07	0,78a \pm 0,05	0,67a \pm 0,08	0,75a \pm 0,05	0,81a \pm 0,1	0,95ab \pm 0,1	1,2b \pm 0,1
SD	2,9c \pm 0,4	2,4b \pm 0,3	2,2b \pm 0,3	2,0b \pm 0,2	2,0b \pm 0,3	1,9b \pm 0,2	1,7b \pm 0,2
SD+O1	1,8b \pm 0,3	1,5b \pm 0,3	1,3b \pm 0,2	1,3b \pm 0,2	1,4b \pm 0,2	1,2b \pm 0,3	1,0b \pm 0,1
SD+O2	2,5b \pm 0,3	1,9b \pm 0,4	1,6b \pm 0,3	1,7b \pm 0,3	1,6b \pm 0,3	1,8b \pm 0,4	1,6b \pm 0,3
SD+O3	0,86a \pm 0,11	0,81a \pm 0,16	0,66a \pm 0,14	0,53a \pm 0,12	0,64a \pm 0,10	0,61a \pm 0,15	0,54a \pm 0,12
Clorpirifos (mg kg^{-1})							
S	3,2c \pm 0,9	3,3c \pm 0,7	3,1c \pm 0,7	3,1c \pm 0,6	3,3c \pm 0,5	3,1c \pm 0,6	3,0c \pm 0,8
S+CL1	2,1b \pm 0,8	1,7b \pm 0,5	1,8b \pm 0,4	2,3b \pm 0,7	2,7b \pm 0,6	3,0c \pm 0,5	3,2c \pm 0,9
S+CL2	2,5b \pm 0,5	2,4b \pm 0,3	2,1b \pm 0,3	2,7b \pm 0,4	3,0c \pm 0,5	3,2c \pm 0,5	3,1c \pm 0,7
S+CL3	1,1b \pm 0,1	0,86a \pm 0,11	1,2b \pm 0,2	1,7b \pm 0,3	2,3b \pm 0,4	2,6b \pm 0,4	2,8b \pm 0,7
SD	2,9b \pm 0,4	2,4b \pm 0,3	2,2b \pm 0,3	2,0b \pm 0,2	2,0b \pm 0,3	1,9b \pm 0,2	1,7b \pm 0,2
SD+CL1	1,9b \pm 0,3	1,3b \pm 0,2	1,1a \pm 0,2	0,97a \pm 0,13	1,1a \pm 0,1	1,3b \pm 0,2	1,2a \pm 0,2
SD+CL2	2,2b \pm 0,4	1,5b \pm 0,3	1,3b \pm 0,2	1,3b \pm 0,2	1,5b \pm 0,2	1,6b \pm 0,3	1,5b \pm 0,2
SD+CL3	0,96a \pm 0,16	0,84a \pm 0,12	0,67a \pm 0,10	0,61a \pm 0,13	0,88a \pm 0,11	1,0a \pm 0,1	1,0a \pm 0,1

4.2.3. Biodiversidad microbiana del suelo

Las Tablas 16 y 17 muestran la evolución de la comunidad microbiana (bacterias y hongos) durante los 120 días de incubación en presencia de oxifluorfen y clorpirifos, respectivamente.

Cuando el herbicida se aplicó al suelo regado periódicamente, la población total de bacterias y hongos significativamente ($p < 0,05$) disminuyó (Tabla 16). En este sentido y comparado con el tratamiento S, la población total de bacterias disminuyó un 10,9%, 20% y 36,5% para los tratamientos S+O2, S+O1 y S+O3, mientras que la población total de hongos significativamente ($p < 0,05$) disminuyó un 11,6%, 18% y 20,4% para los tratamientos S+O2, S+O1 y S+O3, respectivamente.

Cuando clorpirifos se aplicó al suelo regado periódicamente durante los 120 días de incubación, la población total de bacterias y hongos disminuyó significativamente ($p < 0,05$) a los 10 días de iniciado el experimento (Tabla 17). Así, a los 10 días del periodo de incubación, y comparado con el tratamiento control, en el suelo con el insecticida, la población de bacterias Gram+ disminuyó un 25,6%, 30,6% y 25,6% en los tratamientos S+CL2, S+CL1 y S+CL3, la población de bacterias Gram- disminuyó un 11,1%, 35,9% y 43% en los tratamientos S+CL2, S+CL1 y S+CL3, y la población total de hongos disminuyó un 21,5%, 27,4% y 34,7% en los tratamientos S+CL2, S+CL1 y S+CL3, respectivamente. Al final del periodo de incubación, la población total de hongos y bacterias en los suelos con el insecticida fue igual a la existente con el suelo sin dicho insecticida.

Cuando el herbicida oxifluorfen y el insecticida clorpirifos se aplicaron en los suelos no regados periódicamente, la evolución de la población microbiana fue diferente a cuando el suelo fue regado. En este sentido, esta población microbiana fue similar al comportamiento bioquímico del suelo, destacando un mayor descenso de población en condiciones de sequía. En el caso del insecticida, este efecto negativo permaneció hasta el final del periodo de incubación.

4. Resultados

Tabla 17. Evolución de bacterias Gram⁺, Gram⁻, bacterias totales PLFAs y hongos PLFAs (ng g⁻¹) (media \pm error estándar, n = 3) en suelos regados y no regados con oxifluorfen durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas (p>0,05).

	bacGram ⁺	bacGram ⁻	Bacterias totales PLFAs	Hongos PLFAs
S (10 días)	621c \pm 34	398b \pm 17	1019d \pm 53	35,0b \pm 3,1
S (50 días)	603c \pm 36	411b \pm 15	1014d \pm 52	34,6b \pm 2,7
S (120 días)	611c \pm 28	406b \pm 26	1017d \pm 52	32,8b \pm 3,3
S+O1 (10 días)	448b \pm 22	276a \pm 22	724b \pm 43	27,7a \pm 2,9
S+O2 (10 días)	503b \pm 27	344b \pm 28	847c \pm 53	29,3a \pm 1,8
S+O3 (10 días)	404b \pm 30	231a \pm 31	635b \pm 63	24,8a \pm 1,1
S+O1 (50 días)	421b \pm 19	259a \pm 12	680b \pm 30	28,2a \pm 2,7
S+O2 (50 días)	499b \pm 25	336b \pm 15	835c \pm 41	27,1a \pm 2,0
S+O3 (50 días)	390a \pm 21	236a \pm 21	626b \pm 40	24,2a \pm 3,5
S+O1 (120 días)	436b \pm 16	273a \pm 25	709b \pm 43	28,7a \pm 1,6
S+O2 (120 días)	546bc \pm 37	362b \pm 18	908cd \pm 51	30,6ab \pm 3,3
S+O3 (120 días)	411b \pm 30	235a \pm 26	646b \pm 49	26,1a \pm 2,8
SD (10 días)	609c \pm 28	387b \pm 23	996d \pm 52	32,1b \pm 3,4
SD (50 días)	580b \pm 31	301b \pm 24	901cd \pm 54	28,3a \pm 2,1
SD (120 días)	503b \pm 22	277a \pm 27	780b \pm 50	26,6a \pm 2,8
SD+O1 (10 días)	431b \pm 17	254a \pm 21	685b \pm 36	25,3a \pm 3,3
SD+O2 (10 días)	495b \pm 24	316b \pm 35	811c \pm 57	26,9a \pm 1,6
SD+O3 (10 días)	379a \pm 27	201a \pm 22	580a \pm 47	23,1a \pm 2,3
SD+O1 (50 días)	366a \pm 14	224a \pm 18	590a \pm 34	24,4a \pm 1,1
SD+O2 (50 días)	422b \pm 26	297b \pm 24	719b \pm 49	25,5a \pm 2,5
SD+O3 (50 días)	305a \pm 19	189a \pm 13	494a \pm 31	22,0a \pm 1,9
SD+O1 (120 días)	374a \pm 20	231a \pm 17	605b \pm 38	23,7a \pm 1,6
SD+O2 (120 días)	436b \pm 27	293b \pm 15	729b \pm 44	26,2a \pm 2,0
SD+O3 (120 días)	297a \pm 15	178a \pm 14	475a \pm 31	22,7a \pm 2,2

4. Resultados

Tabla 18. Evolución de bacterias Gram⁺, Gram⁻, bacterias totales PLFAs y hongos PLFAs (ng g⁻¹) (media ± error estándar, n = 3) en suelos regados y no regados con clorpirifos durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas (p>0,05).

	bacGram ⁺	bacGram ⁻	Bacterias totales PLFAs	Hongos PLFAs
S (10 días)	621c ± 34	398b ± 17	1019c ± 53	35,4b ± 3,1
S (50 días)	603c ± 36	411b ± 15	1014c ± 52	33,6b ± 2,7
S (120 días)	611c ± 28	406b ± 26	1017c ± 52	32,8b ± 3,3
S+O1 (10 días)	394b ± 17	255a ± 22	649b ± 41	25,7a ± 2,0
S+O2 (10 días)	462b ± 29	354 ± 26	816b ± 53	26,8a ± 2,7
S+O3 (10 días)	275a ± 14	227a ± 19	502a ± 31	23,1a ± 1,6
S+O1 (50 días)	431b ± 20	288a ± 11	719b ± 32	25,8a ± 2,4
S+O2 (50 días)	483b ± 31	385 ± 22	868c ± 51	28,4a ± 2,2
S+O3 (50 días)	376b ± 25	225a ± 18	601b ± 54	25,1a ± 1,9
S+O1 (120 días)	616c ± 37	420b ± 25	1036c ± 60	34,6b ± 2,7
S+O2 (120 días)	624c ± 30	417b ± 16	1041c ± 45	35,2b ± 3,5
S+O3 (120 días)	609c ± 28	398b ± 21	1007c ± 47	34,8b ± 3,0
SD (10 días)	609c ± 28	387b ± 23	996c ± 52	32,1b ± 3,4
SD (50 días)	580b ± 31	301ab ± 24	901c ± 54	28,3a ± 2,1
SD (120 días)	503b ± 22	277a ± 27	780b ± 50	26,6a ± 2,8
SD+O1 (10 días)	386b ± 20	261a ± 25	647b ± 47	27,0a ± 2,2
SD+O2 (10 días)	471b ± 33	346 ± 19	817b ± 50	26,6a ± 2,5
SD+O3 (10 días)	226a ± 19	138a ± 22	364a ± 43	24,6a ± 2,0
SD+O1 (50 días)	318b ± 17	220a ± 22	538b ± 41	24,8a ± 1,7
SD+O2 (50 días)	386b ± 28	258a ± 23	644b ± 50	27,1a ± 2,0
SD+O3 (50 días)	189a ± 16	112a ± 14	301a ± 31	21,2a ± 1,5
SD+O1 (120 días)	274a ± 21	284a ± 26	558b ± 48	28,3a ± 2,1
SD+O2 (120 días)	325b ± 26	348b ± 22	673b ± 49	31,0b ± 2,2
SD+O3 (120 días)	246a ± 18	201a ± 27	447a ± 44	22,6a ± 1,8

4.2.4. Evolución de los plaguicidas en suelo

La Tabla 18 muestra la evolución de los dos plaguicidas experimentales durante el periodo de incubación para los suelos regados y no regados de forma periódica. En los suelos regados, los resultados revelan una disminución progresiva de ambos plaguicidas a lo largo del tiempo.

La degradación de dichos plaguicidas es más rápida en el caso de clorpirifos que en el caso de oxifluorfen. Del mismo modo, la dosis también juega un papel importante, destacando que dicha degradación fue mayor cuando la dosis de plaguicida utilizado fue menor.

Cuando los plaguicidas se aplicaron en condiciones de sequía severa, la degradación de los mismos fue mucho más lenta, lo cual hace pensar que en estas condiciones de humedad, la persistencia en el suelo de estos compuestos químicos aumenta. De nuevo, la dosis de plaguicida aplicado también influyó en su degradación en tales condiciones de sequía severa.

Tabla 19. Evolución de oxifluorfen y clorpirifos(media \pm error estándar, $n = 3$) en suelos regados y no regados con clorpirifos durante el periodo experimental. Columnas con la misma letra(s) no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

	Oxifluorfen (mg kg ⁻¹)						
	5	12	26	50	79	100	120
S+O1	0,241e \pm 0,034	0,194d \pm 0,024	0,119d \pm 0,014	0,084c \pm 0,015	0,051b \pm 0,009	0,040b \pm 0,023	0,022ab \pm 0,007
S+O2	0,113d \pm 0,027	0,078c \pm 0,006	0,045b \pm 0,009	0,033b \pm 0,008	0,021a \pm 0,018	0,018a \pm 0,004	0,012a \pm 0,005
S+O3	0,419f \pm 0,059	0,361e \pm 0,046	0,206d \pm 0,035	0,158d \pm 0,006	0,114c \pm 0,016	0,092c \pm 0,014	0,055c \pm 0,004
SD+O1	0,221e \pm 0,063	0,216d \pm 0,038	0,172d \pm 0,022	0,12d \pm 0,005	0,093c \pm 0,015	0,075c \pm 0,009	0,058c \pm 0,013
SD+O2	0,104d \pm 0,02	0,092c \pm 0,009	0,071c \pm 0,006	0,056c \pm 0,008	0,044b \pm 0,012	0,032b \pm 0,007	0,03b \pm 0,011
SD+O3	0,395f \pm 0,027	0,373e \pm 0,031	0,318e \pm 0,063	0,266e \pm 0,034	0,172d \pm 0,023	0,121d \pm 0,022	0,092c \pm 0,007
Clorpirifos (mg kg ⁻¹)							
S+CL1	0,626f \pm 0,087	0,473e \pm 0,072	0,235d \pm 0,066	0,103d \pm 0,057	0,025b \pm 0,007	0,009a \pm 0,001	
S+ CL2	0,317e \pm 0,068	0,228d \pm 0,069	0,123d \pm 0,028	0,061c \pm 0,011	0,011b \pm 0,003		
S+ CL3	1,191f \pm 0,122	0,924f \pm 0,066	0,461e \pm 0,069	0,198d \pm 0,043	0,044c \pm 0,008	0,013b \pm 0,004	0,004a \pm 0,001
SD+ CL1	0,615 \pm 0,056	0,598f \pm 0,081	0,351e \pm 0,058	0,272d \pm 0,059	0,202d \pm 0,038	0,121d \pm 0,031	0,053c \pm 0,010
SD+ CL2	0,308e \pm 0,074	0,296d \pm 0,078	0,164d \pm 0,046	0,128d \pm 0,062	0,099c \pm 0,012	0,051c \pm 0,012	0,029b \pm 0,008
SD+ CL3	1,184f \pm 0,108	1,120f \pm 0,097	0,692f \pm 0,055	0,536e \pm 0,067	0,387e \pm 0,039	0,233d \pm 0,067	0,165d \pm 0,078

5. DISCUSSION

5.1. PRIMERA EXPERIENCIA DE INCUBACIÓN

5.1.1. Suelos regados

En suelos regados periódicamente, el aporte de carbono fácilmente metabolizable procedente de los residuos orgánicos es el causante del aumento considerable del carbono de la biomasa microbiana del suelo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Arancon et al., (2006) y Tejada et al. (2006; 2010a) tras la aplicación de diversas fuentes de materia orgánica, de diferente naturaleza química, tales como vermicompost, compost de residuos vegetales, gallinaza, etc.

Sin embargo, este carbono de la biomasa microbiana tuvo una evolución diferente dependiendo de la composición química del residuo orgánico aplicado al suelo. En este sentido, Jorge-Mardomingo et al. (2013) destacan que la evolución del carbono de la biomasa microbiana depende de la composición química del material orgánico aplicado al suelo. Por una parte, los mayores valores de carbono soluble y carbono de ácidos fúlvicos en el suelo enmendado con estiércol de oveja (SM) indican que dicho residuo orgánico muestra una mayor fracción lábil de materia orgánica que el estiércol de vaca (CM) y que el residuo sólido urbano (MSW). La fracción lábil de la materia orgánica es la más degradable y, por lo tanto, la más susceptible de mineralizarse (Cook y Allan, 1992; Tejada et al., 2006), actuando como una fuente de energía inmediata para los microorganismos.

Por otro lado, la evolución del tamaño de proteína en suelo también nos da una buena información acerca de qué residuo orgánico es más fácilmente degradable. Los estudios llevados a cabo por Tejada et al. (2013) y Gómez et al. (2014) encontraron que después de aplicar al suelo distintos residuos orgánicos, la actividad microbiana del suelo mostró un mayor incremento cuando dicho residuo orgánico contenía una mayor proporción de proteínas de bajo peso molecular. En nuestro experimento, los mayores porcentajes de proteínas de menor peso molecular se obtuvieron en el suelo enmendado con estiércol de oveja, seguido de estiércol de vaca y de residuo sólido urbano, lo cual, confirma la mayor biodegradabilidad del residuo obtenido a partir de estiércol de oveja. De acuerdo con Vasileva-Tonkova et al. (2007), la disminución en el tamaño molecular de la proteína indica que el nitrógeno está en una forma más fácilmente disponible para los microorganismos del suelo. Esto, a su vez, promueve una mayor proliferación de los mismos.

Por otro lado, el hecho de que tras la aplicación de dichos residuos orgánicos hubiese una estimulación significativa del carbono de la biomasa microbiana del suelo, sugiere que el contenido de metales pesados de dichos compuestos orgánicos no es tóxico a los microorganismos del suelo. A este respecto, Brendecke et al. (1993), Fließbach et al. (1994) y Filip y Bielek (2002) observaron una disminución del carbono de la biomasa microbiana del suelo después de 10 años de aplicación de 5 y 15 t ha⁻¹ año de lodos de depuradora. Estos autores indicaron que la presencia de altas cantidades de metales pesados (Cd, Cr, Hg, Pb, etc.) en los residuos orgánicos puede contrarrestar los efectos positivos de la materia orgánica en la biomasa microbiana del suelo.

Puesto que los microorganismos del suelo degradan la materia orgánica liberando al exterior enzimas extracelulares que se acoplan a dichos sustratos orgánicos, la aplicación de los residuos orgánicos experimentales aumentó significativamente las distintas actividades enzimáticas (tanto intra- como extracelulares) determinadas en esta memoria, así como la biodiversidad microbiana de dichos suelos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Bastida et al. (2008), Tejada et al. (2008a) y Torres et al. (2015), los cuales observaron un aumento en las actividades enzimáticas del suelo y población de bacterias y hongos después de la incorporación al suelo de diferentes residuos orgánicos, tales como estiércol de gallinaza, compost de algodón triturado, bioestimulantes (obtenidos a partir de destilados de trigo, plumas de aves de corral), desechos de poda y compost de lodos de depuradora. El aumento de la comunidad microbiana observado en los suelos modificados orgánicamente, puede deberse a la incorporación de compuestos fácilmente biodegradables en el material orgánico, que estimula la actividad de los microorganismos indígenas del suelo y la incorporación de microorganismos exógenos (Tejada et al., 2006). El aumento de la actividad de la deshidrogenasa en suelos orgánicos sugiere la disponibilidad de compuestos biodegradables en el material orgánico aplicado, aumentando así la actividad microbiana del suelo (Ros et al., 2003; Tejada et al., 2006). Dado que los microorganismos del suelo degradan la materia orgánica a través de la producción de diversas enzimas extracelulares, la aplicación de materia orgánica al suelo aumentó las actividades enzimáticas del este.

Al igual que el carbono de la biomasa microbiana del suelo fue diferente dependiendo de la composición química del residuo orgánico aplicado al suelo, los valores de las actividades enzimáticas también mostraron esta variabilidad, correspondiendo también los mayores al suelo enmendado con estiércol de oveja, seguido

del suelo enmendado con el estiércol de vaca y por el residuo sólido urbano, sugiriendo que la fracción lábil de la materia orgánica es la más susceptible de sufrir mineralización, actuando como una fuente de energía inmediata para los microorganismos.

Marschner et al. (2003) sugirieron que, para obtener nutrientes, la degradación de la materia orgánica requiere enzimas excretadas por microorganismos del suelo. Probablemente, este aumento en la concentración de nutrientes es responsable de una creciente población de estos microorganismos. Debido a que el estiércol de oveja tiene un mayor contenido de ácidos fúlvicos, cuando se aplicó al suelo, además de tener una mayor actividad enzimática, también es responsable del aumento de la diversidad microbiana del suelo.

Respecto a la evolución de la composición de la materia orgánica, los resultados obtenidos en los espectros de RMN de ^{13}C en estado sólido indican que la región C O-alquilo disminuyó en suelos enmendados orgánicamente. Esta disminución fue mayor en el suelo enmendado con el residuo sólido urbano, seguido de los suelos enmendados con estiércol de vaca y oveja, respectivamente. El resto de las regiones analizadas aumentaron al final del período de incubación. Estos resultados son la consecuencia del hecho de que el O-alquilo se considera como una forma fácilmente degradable de carbono orgánico. Como resultado de la degradación de materia orgánica, y para cada tratamiento experimental, la relación A/O-A aumentó a lo largo del experimento.

5.1.2. Suelos no regados

Los resultados obtenidos sugieren, que una sequía severa y prolongada durante un período de 1 año afectó negativamente las actividades enzimáticas así como a la composición y diversidad de las concentraciones bacterianas y fúngicas totales de PLFA, causando a la vez cambios significativos en la evolución de la materia orgánica aplicada al suelo. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Xu et al. (2009), Hueso et al. (2012a, b), Baldrian et al. (2013) y Acosta-Martínez et al. (2014), los cuales encontraron que una disminución significativa en la humedad pueden afectar los procesos microbianos del suelo y por lo tanto, a la degradación de la materia orgánica.

La mineralización de la materia orgánica, es un proceso biológico llevado a cabo por enzimas extracelulares excretadas, principalmente, por bacterias y hongos (Gomoryova et al, 2013). Diversos estudios han demostrado, que el secado del suelo

puede representar un importante estrés para los microorganismos del suelo, ya que el agua es un recurso esencial y necesario que afecta la supervivencia y el estado fisiológico de los microorganismos (Van Meeteren et al., 2008). Según Lamersdorf et al. (1998), una sequía severa representa una situación crítica para los microorganismos del suelo y puede causar un "downshock" que puede afectar el estado osmótico de las células microbianas y que podría conducir a la muerte celular. Además, Schimel et al. (2007) encontraron que la disponibilidad de agua puede afectar la disponibilidad de sustratos, la difusión de gases, el pH y la temperatura del suelo y, por tanto, podría ser responsable de los bajos valores encontrados en las actividades enzimáticas del suelo y la disminución de la población bacteriana y fúngica del suelo.

Respecto a la comunidad microbiana, es destacable que, a corto plazo (30 días), la sequía sólo afectó a las poblaciones de bacterias Gram- y hongos, sin afectar a la población de bacterias Gram+. Sólo al final del experimento (365 días) la población de bacterias Gram+ también disminuyó en comparación con la obtenida para los suelos regados. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Bérard et al. (2011), quien observó que, después de 21 días de sequía, la población de bacterias Gram+ no había cambiado con respecto al suelo que no había sido sometido a sequía, posiblemente porque tienen paredes celulares más rígidas, haciéndolas más resistentes a los procesos de secado (Uhlírova et al., 2005).

Como consecuencia de la disminución en la actividad bioquímica de los microorganismos del suelo, la degradación de las proteínas también disminuyó, aunque no afectó a la degradación de los ácidos húmicos y fúlvicos del suelo. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Van Meeteren et al. (2008) y Muhr et al. (2010), los cuales encontraron una disminución de la mineralización de la materia orgánica del suelo bajo condiciones de sequía. No obstante, la disminución en las propiedades bioquímicas del suelo originó un aumento progresivo en el contenido de carbohidratos solubles en agua. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kohler et al. (2009) y Hueso et al. (2011), quienes observaron un aumento en el contenido de carbohidratos solubles del suelo bajo condiciones de sequía, que podría ser como consecuencia de un aumento en la producción de carbohidratos por microorganismos como mecanismo de defensa contra el bajo potencial de agua externa, debido a que estos compuestos son hidrofílicos y pueden mantener un mayor contenido de agua en su microambiente.

Los espectros de RMN obtenidos en condiciones de sequía mostraron cambios para todas las regiones analizadas, al final del período de incubación y para cada tratamiento de fertilizante. A este respecto y al final del período experimental, el O-alquilo aumentó y el C alquilo disminuyó, coincidiendo con el aumento de la concentración de carbohidratos solubles en agua. Asimismo, la relación A/O-A disminuyó al final del experimento, destacando la menor degradación del material orgánico aplicado al suelo.

La aplicación de materia orgánica al suelo, hizo que la humedad descendiera menos bruscamente y fuese un descenso más lento y progresivo a lo largo del tiempo. Además, la composición química de la materia orgánica influyó notablemente en el contenido de agua durante el período experimental. En este sentido, varios autores han demostrado el papel crucial de la materia orgánica junto con la textura, en la sorción del agua y, por consiguiente, en el contenido de humedad del suelo (Rawls et al., 2003; Yang et al., 2014). Sin embargo, los resultados obtenidos también sugieren, que la composición química de la materia orgánica aplicada al suelo influye fuertemente en la humedad del suelo. Los estudios de sorción de xenobióticos orgánicos e inorgánicos en suelos enmendados con diferentes fuentes de materia orgánica sugieren que la sorción es mayor cuando el contenido de ácidos húmicos es mayor, posiblemente debido al mayor número de grupos carboxílicos y fenólicos (Tejada y Masciandaro, 2011; Tejada et al., 2008b, 2010b). La Tabla 4 indica un mayor número de grupos carboxílico y fenólico en el estiércol de oveja, seguido del estiércol de vaca y residuo sólido urbano. Quizás esta es la razón por la cual el aumento de retención de agua en los suelos enmendados fue mayor en el tratamiento SM, seguido por CM y MSW, respectivamente. Como resultado de este mayor contenido de agua en los suelos enmendados orgánicamente, las actividades enzimáticas fueron mayores en comparación con los suelos no enmendados, mientras que la población de bacterias y hongos sufrió menores descensos.

A pesar de la desaceleración en la mineralización de la materia orgánica, el contenido de carbohidratos solubles en agua fue mayor en el suelo enmendado con SM que en el suelo seguido del suelo enmendado con CM y MSW. Esto puede deberse a dos causas: en primer lugar, la mayor retención de agua se produjo en el suelo enmendado con el estiércol de oveja; y por otro lado, el suelo enmendado con este residuo orgánico mostraba un mayor valor en el carbono de la biomasa microbiana y, por lo tanto, un mayor número de microorganismos para degradar los compuestos orgánicos más lábiles.

Además, hay un aumento en la producción de carbohidratos por los microorganismos como un mecanismo de defensa, como se discutió anteriormente.

5.2. SEGUNDA EXPERIENCIA DE INCUBACIÓN

5.2.1. Suelos regados

Los resultados obtenidos para los suelos regados periódicamente durante el periodo experimental sugieren que el herbicida oxifluorfen y el insecticida clorpirifos causaron un efecto tóxico sobre las propiedades bioquímicas del suelo así como en la biodiversidad microbiana de dichos suelos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sheeba Singh et al. (2011), Kadian et al. (2012), Rodríguez-Morgado et al. (2014), Gómez et al. (2014), y Tejada et al. (2011, 2014, 2016), los cuales encontraron una importante inhibición tanto en las actividades enzimáticas del suelo como en su biodiversidad cuando se aplicó oxifluorfen y clorpirifos debido al efecto contaminante de ambos plaguicidas.

De acuerdo con Tejada et al., (2015), el efecto inhibitorio de estos plaguicidas sobre las actividades enzimáticas del suelo es probablemente debido a la supresión de las poblaciones microbianas involucradas en los ciclos N, P y S; y/o al hecho de que pueden obstaculizar, modificar o alterar la interacción de los sitios sustrato orgánico y enzima.

Este efecto tóxico afecta directamente a la inhibición de la mayoría de las poblaciones microbianas del suelo, quedando activos algunos grupos microbianos (bacterias y hongos) restantes capaces de adaptarse y crecer en presencia de ambos plaguicidas. Estos microorganismos tolerantes a la toxicidad de estos plaguicidas son los encargados de ir degradándolos poco a poco, lo cual conlleva incrementos tanto en la población microbiana como en las actividades enzimáticas de los suelos. Dichos microorganismos pueden utilizar los plaguicidas como fuente de carbono y energía para su crecimiento y desarrollo, transformando y degradando estos compuestos orgánicos en compuestos menos tóxicos. Estos resultados también están de acuerdo con los obtenidos por Goswami et al. (2013), los cuales estudiaron el comportamiento de la biomasa microbiana del suelo después de la adición del insecticida cipermetrina. Según estos investigadores, este aumento podría deberse al hecho de que los plaguicidas o sus productos de descomposición y las células microbianas posteriormente matadas por el plaguicida, pueden ser utilizados como fuente de energía o fuente de carbono para la

proliferación celular de los microorganismos supervivientes. La población microbiana y las actividades enzimáticas del suelo aumentaron rápidamente, alcanzando valores superiores a los de suelo no contaminado.

De acuerdo a los resultados obtenidos por Rodríguez-Morgado et al. (2014), Gómez et al. (2014) y Tejada et al. (2011, 2014, 2016), los resultados obtenidos en este estudio muestran una alta persistencia en el suelo tanto del oxifluorfen como de clorpirifos. Sin embargo, esta persistencia dependió de la dosis de los plaguicidas aplicados.

5.2.2. Suelos no regados

En los suelos no regados periódicamente durante el periodo de incubación, las distintas actividades enzimáticas y biodiversidad microbiana estudiadas fueron menores que en el caso de suelo regado durante el periodo experimental. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores, como Hueso et al. (2011, 2012b) y Acosta-Martínez et al. (2014), quienes encontraron un descenso en las propiedades biológicas del suelo bajo condiciones de sequía severa, lo cual pone de manifiesto que la humedad del suelo influyó notablemente tanto en su actividad bioquímica como en la comunidad microbiana.

En los suelos mediterráneos, el agua es un recurso crítico y esencial para el desarrollo, crecimiento y supervivencia de los microorganismos del suelo (Hueso et al., 2011, 2012a, b). Por otro lado, se ha observado también que la disponibilidad de agua puede afectar la disponibilidad de sustratos, la difusión de gases, el pH del suelo y la temperatura (Schimel et al., 2007). Todas estas causas pueden ser responsables de los bajos valores encontrados tanto en las actividades enzimáticas del suelo como en la población microbiana de dicho suelo.

El comportamiento de los herbicidas en el suelo sometido a sequía severa fue diferente del suelo regado periódicamente. En el suelo sometido a sequía, los herbicidas mostraron un mayor efecto tóxico sobre las distintas actividades enzimáticas y biodiversidad microbiana estudiadas, principalmente cuando la dosis de plaguicida utilizada fue el doble de la dosis recomendada.

Posiblemente, este mayor efecto de los plaguicidas en condiciones de sequía severa pueda ser consecuencia del efecto combinado de tres causas:

- 1) Efecto tóxico de los plaguicidas en los microorganismos del suelo, anteriormente descrito, y por lo tanto al principio del experimento sólo los microorganismos tolerantes pueden crecer en presencia de estos compuestos químicos.
- 2) Una posible disminución en la disponibilidad de sustratos
- 3) La supervivencia de microorganismos del suelo resistentes a condiciones de sequía.

Como consecuencia de estos 3 hechos, la degradación de los plaguicidas en condiciones de sequía severa es mucho más lenta a lo largo del tiempo que en condiciones de no sequía, persistiendo los mismos un mayor periodo de tiempo y, por tanto, provocando una mayor toxicidad de estos plaguicidas en el medio ambiente.

6. CONCLUSIONES

Del estudio de cómo afecta la sequía severa en las propiedades químicas y bioquímicas de un suelo mediterráneo tras someterlo a diversas prácticas agrícolas tales como la aplicación de distintas fuentes de materia orgánica, o de diferentes plaguicidas, se exponen a continuación las conclusiones más relevantes:

1. Primera experiencia de incubación

- 1.1. La evolución de la materia orgánica en suelos regados depende principalmente de su composición química, sugiriendo que la fracción lábil de la materia orgánica es la más susceptible a la mineralización, actuando como una fuente de energía inmediata para los microorganismos
- 1.2. Los resultados obtenidos en los espectros de RMN de ^{13}C en estado sólido indican que la región O-alquilo disminuyó en suelos enmendados orgánicamente. Esta disminución fue mayor en el suelo enmendado con el residuo sólido urbano, seguido de los suelos enmendados con estiércol de vaca y oveja, respectivamente. Estos resultados son la consecuencia de que el O-alquilo se considera una forma fácilmente degradable de carbono orgánico.
- 1.3. El agua es un recurso esencial y necesario que afecta la supervivencia y el estado fisiológico de los microorganismos. Una sequía prolongada de 12 meses tiene un efecto negativo significativo tanto sobre las actividades enzimáticas del suelo como sobre su biodiversidad microbiana, y en consecuencia sobre la mineralización de la materia orgánica aplicada. Este hecho se debe al estrés al que pueden estar sometidos los microorganismos del suelo en tales condiciones, donde la disponibilidad de agua puede afectar la disponibilidad de sustratos, la difusión de gases, el pH y la temperatura del suelo y, por tanto, podría ser responsable de los bajos valores encontrados en las actividades enzimáticas del suelo y la disminución de la población bacteriana y fúngica.
- 1.4. La comunidad microbiana del suelo fue afectada de diferente forma. A corto plazo, la sequía solo afectó a las poblaciones de bacterias Gram- y hongos, sin

afectar a la población de bacterias Gram +, posiblemente porque estas bacterias tienen paredes celulares más rígidas, haciéndolas más resistentes a los procesos de secado. En periodos de sequía más largos, tanto bacterias Gram+ como Gram- y hongos se encontraron negativamente afectados.

- 1.5. La aplicación de materia orgánica al suelo sometido a sequía hace disminuir menos bruscamente el contenido de humedad de dicho suelo, debido a la sorción de agua por parte de la materia orgánica. Esta sorción es mayor cuanto mayor es el contenido en ácidos húmicos de dicha materia orgánica. En este caso, los efectos negativos sobre la comunidad microbiana del suelo y su actividad bioquímica disminuyeron significativamente. En consecuencia, nuestro estudio demuestra la importancia de la gestión de la materia orgánica del suelo para hacer frente a los procesos de sequía climática.

2. Segunda experiencia de incubación

- 2.1. En condiciones de sequía, la persistencia de los plaguicidas en suelo aumenta con el tiempo, y en consecuencia, puede persistir un mayor periodo de tiempo el efecto tóxico que algunos de estos plaguicidas pueden ejercer en el suelo. Este mayor efecto de los plaguicidas en condiciones de sequía severa pueda ser consecuencia del efecto combinado de tres causas: (1) efecto tóxico de los plaguicidas en los microorganismos del suelo que hace que solo se desarrollen los tolerantes a dichos compuestos químicos; (2) una posible disminución en la disponibilidad de sustratos; y (3) la supervivencia de microorganismos del suelo resistentes a condiciones de sequía.

7. BIBLIOGRAFIA

- Acosta-Martinez, V., Moore-Kucera, J., Cotton, J., Gardner, T., Wester, D. 2014. Soil enzyme activities during the 2011 Texas record drought/heat wave and implications to biogeochemical cycling and organic matter dynamics. *Applied Soil Ecology* 75, 43-51.
- Aguilera, E., Lassaletta, L., Sanz-Cobena, A., Garniere, J., Vallejo, A. 2013. The potential of organic fertilizers and water management to reduce N₂O emissions in Mediterranean climate cropping systems. A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 164, 32-52.
- Alexander, M. 1980. Introduction to Soil Microbiology. 2^a Edición. John Wiley and Sons, Inc.
- Alluvione, F., Bertora, C., Zavattaro, L., Grignani, C. 2010. Nitrous oxide and carbon dioxide emissions following green manure and compost fertilization in corn. *Soil Science Society of America Journal* 74, 384-395.
- Alpert, P., et al., 2006. Relations between climate variability in the Mediterranean region and the Tropics: ENSO, South Asian and African monsoons, hurricanes and Saharan dust. In: Lionello, P., Malanotte-Rizzoli, P., Boscolo, R. (Eds.), *Mediterranean Climate Variability*. Elsevier, Amsterdam, pp. 149-177.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Shenck, F.J. 2003. Fast and easy multiresidue method employing extraction/partitioning and dispersive solid phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 86, 412-431.
- Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M.A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell'Amico, E., Colombo, M., Gianfreda, L. 2004. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 57, 401-412.
- Arancon, N.Q., Edwards, C.A., Bierman, P. 2006. Influences of vermicomposts on field strawberries: Part 2. Effects on soil microbiological and chemical properties. *Bioresource Technology* 97, 831-840.
- Arshad, M.A., Coen, G.M. 1992. Characterization of soil quality: physical and chemical criteria. *American Journal of Alternative Agriculture* 7, 25-31.
- Astier-Calderón, M., Maass-Moreno, M., Etchevers-Barra, J. 2002. Derivación de indicadores de calidad de suelos en el contexto de la agricultura sustentable. *Agrociencia* 36, 605-620.
- Atlas, R.M., Bartha, R. 1998. Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. Benjamin/Cummings. Redwood City. CA.

- Audsley, E., Pearn, K.R., Simota, C., Cojocar, G., Koutsidou, E., Rounsevell, M.D.A., Trnka, M., Alexandrov, V. 2006. What can scenario modelling tell us about future European scale agricultural land use, and what not? *Environmental Science and Policy* 9, 148-62.
- Bååth, E. 2003. The use of neutral lipid fatty acids to indicate the physiological conditions of soil fungi. *Microbial Ecology* 45, 373-383.
- Baldrian, P., Šnajdr, J., Merhautová, V., Dobiašová, P., Cajthaml, T., Valášková V. 2013. Responses of the extracellular enzyme activities in hardwood forest to soil temperature and seasonality and the potential effects of climate change. *Soil Biology and Biochemistry* 56, 60-68.
- Bardgett, R.D., Hobbs, P.J., Frostegard, A. 1996. Changes in soil fungal: bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biology and Fertility of Soils* 22, 261-264.
- Bardgett, R. D., McAlister, E. 1999. The measurement of soil fungal: bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands. *Biology and Fertility of Soils* 29, 282-290.
- Bastida, F., Kandeler, E., Moreno, J.L., Ros, M., García, C., Hernández, T. 2008. Application of fresh and composted organic waste modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology* 40, 318-329.
- Beare, M., Gregorich, E., St-Georges, P. 2009. Compaction effects on CO₂ and N₂O production during drying and rewetting of soil. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 611-621.
- Benítez, E., Nogales, R., Campos, M., Ruano, F. 2006. Biochemical variability of olive-orchard soils under different management systems. *Applied Soil Ecology* 32, 221-231.
- Bérard, A., Bouchet, T., Sévenier, G., Pablo, A.L., Gros, R. 2011. Resilience of soil microbial communities impacted by severe drought and high temperature in the context of Mediterranean heat waves. *European Journal of Soil Biology* 47, 333-342.
- Berns, A.E., Philipp, H., Narres, H.D., Burauel, P., Vereecken, H., Tappe, W. 2008. Effect of gamma-sterilization and autoclaving on soil organic matter structure as studied by solid state NMR, UV and fluorescence spectroscopy. *European Journal of Soil Science* 59, 540-550.

- Brendecke, J.W., Axelson, R.D., Pepper, I.L. 1993. Soil microbial activity as an indicator of soil fertility: long-term effects of municipal sewage sludge on an arid soil. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 751-758.
- Ceccanti, B., Nannipieri, P., Cervelli, S., Sequi, P. 1978. Fractionation of humus-urease complex. *Soil Biology and Biochemistry* 10, 39-45.
- Chen, M.-M., Zhu, Y.-G., Su, Y.-H., Chen, B.-D., Fu, B.-J., Marschner, P. 2007. Effects of soil moisture and plant interactions on the soil microbial community structure. *European Journal of Soil Biology* 43, 31-38.
- Collet, L., Ruelland, D., Estupina, V.B., Dezetter, A., Servat, E. 2015. Water supply sustainability and adaptation strategies under anthropogenic and climatic changes of a meso-scale Mediterranean catchment. *Science of Total Environment* 536, 589-602.
- Cook, B.D., Allan, D.L. 1992. Dissolved organic matter in old field soils: total amounts as a measure of available resources for soil mineralization. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 585-594.
- Cook, R.L., Langford, C.H., Yamdagni, R., Preston, C.M. 1996. A modified cross-polarization magic angle spinning ^{13}C NMR procedure for the study of humic materials. *Analytical Chemistry* 68, 3979-3986.
- Cowan, D., Meyer, Q., Stafford, W., Muyanga, S., Cameron, R., Wittwer, P. 2005. Metagenomic gene discovery: past, present and future. *Trends in Biotechnology* 23, 321-329.
- Coyne, M. 2000. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Editorial Paraninfo, España.
- Curiel Yuste, J., Fernandez-Gonzalez, A.J., Fernandez-Lopez, M., Ogaya, R., Penuelas, J., Sardans, J., Lloret, F. 2014. Strong functional stability of soil microbial communities under semiarid Mediterranean conditions and subjected to long-term shifts in baseline precipitation. *Soil Biology and Biochemistry* 69, 223-233.
- Davies, C. W. 1962. Ion Associations. Butterworths, London.
- Dick, R.P., Breakwill, D., Turco, R. 1996. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrating biological indicators. p. 247-272. In: Doran, J.W., Jones, A.J. (Eds.), Handbook of Methods for Assessment of Soil Quality. Soil Science Society America, Madison.

- Doran, J.W., Parkin, T.B. 1994. Defining and assessing soil quality. In J.W. Doran et al (ed.) Defining soil quality for a sustainable environment. SSSA Special Publ. 35. SSSA and ASA. Madison, WI, p. 3-21.
- Draggan, S. 1977. Effects of substrate type and arsenic dosage level on arsenic behaviour in grassland microcosms. Part I. Preliminary results on ⁷⁴As transport. En "Terrestrial microcosms and environmental chemistry, proceedings." June 13-17, Corvallis, Oregon; National Science Foundation, Washington D.C. Report NSF/RA-790026.
- Dungait, J.A.J., Kemmitt, S.J., Michallon, M., Guo, S., Wen, Q., Brookes, P.C., Evershed, R.P. 2010. Variable responses of the soil microbial biomass to trace concentrations of ¹³C labelled glucose, using ¹³C- PLFA analysis. *European Journal of Soil Science*. 62, 117- 376 126.
- Eivazi, F., Tabatabai, M. A. 1988. Glucosidases and galactosidase in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 20, 601-606.
- Ewert, F., Rounsevell, M.D.A., Reginster, I., Metzger, M.J., Leemans, R. 2005. Future scenarios of European agricultural land use I. Estimating changes in crop productivity. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 107, 101-116.
- FAO, 1989. Cartemondiale des sols. Légende révisée, p. 125.
- Federle, T.W., Dobbins, D.C., Thornton-Manning, J.R., Jones, D.D. 1986. Microbial biomass, activity, and community structure in subsurface soils. *Ground Water* 24, 365-374.
- Fließbach, A., Martens, R., Reber, H.H. 1994. Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 1201-1205.
- Filip, Z., Bielek, P. 2002. Susceptibility of humic acids from soils with various contents of metals to microbial utilization and transformation. *Biology and Fertility of Soils* 36, 426-433.
- Frostegard, A., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F., Jeannin, P., Nesme, X., Simonet, P. 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5409-5420.
- Frostegard, Å., Tunlid, A., Bååth, E. 1993. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types

- experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3605-3617.
- Gabriel, C.-E., Kellman, L. 2014. Investigating the role of moisture as an environmental constraint in the decomposition of shallow and deep mineral soil organic matter of a temperate coniferous soil. *Soil Biology and Biochemistry* 68, 373-384.
- Garbeva, P., v. Veen, J.A., v. Elsas, J.D. 2004. Microbial diversity in soil: Selection of microbial opulations by plant and soil type and Implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* 42, 243-270
- García, C., Hernandez, T., Costa, F. 1990. Study on water extract of sewage-sludge compost. *Soil Science and Plant Nutrition* 37, 399-408.
- García, C., Hernández, T., Costa, F., Ceccanti, B., Masciandaro, G. 1993. The dehydrogenase activity of soils: an ecological marker in processes of perturbed system regeneration. En: Gallargo, J.F. (Ed.). XI International Symposium of Environmental Biogeochemistry, Salamanca.
- Gillet J.W, Witt, J. M. 1980. Chemical evaluation projected application of terrestrial microcosms technology. En "Microcosms in ecological research", Giesey J.P. Jr (Ed), U.S. Department of Energy.
- Giorgi, F., 2006. Climate change Hot-spots. *Geophysical Research Letters* 33, L08707.
- Giorgi, F., Lionello, P. 2008. Climate change projections for the Mediterranean region. *Global and Planetary Change* 63, 90-104.
- GISTEMP Team, 2016: *GISS Surface Temperature Analysis (GISTEMP)*. NASA Goddard Institute for Space Studies. Dataset accessed 20YY-MM-DD at <http://data.giss.nasa.gov/gistemp/>.
- Gómez, I., Rodríguez-Morgado, B., Parrado, J., García, C., Hernández, T., Tejada, M. 2014. Behavior of oxyfluorfen in soils amended with different sources of organic matter. Effects on soils biology. *Journal of Hazardous Materials* 273, 207-214.
- Gomoryova, E., Štřelcova, K., Škvarenina, J., Gomory, D. 2013. Responses of soil microorganisms and water content in forest floor horizons to environmental factors. *European Journal of Soil Biology* 55, 71-76.
- Goncalves, C.N., Dalmolin, R.S.D., Dick, D.P., Knicker, H., Klamt, E., Kogel-Knabner, I. 2003. The effect of 10% HF treatment on the resolution of CPMAS ¹³C NMR spectra and on the quality of organic matter in Ferralsols. *Geoderma* 116, 373-392.

- Goswami, M.R., Pati, U.K., Chowdhury, A., Mukhopadhyay, A. 2013. Studies on the effect of cypermethrin on soil microbial biomass and its activity in an alluvial soil. *International Journal of Agricultural and Food Science* 3, 1-9.
- Gregorich, E. G., Monreal, C. M., Carter, M. R., Angers, D. A., Ellert, B.H. 1994. Towards a minimum data set to asses soil organic matter quality in agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science* 74, 367-385.
- Guitian, F., Carballas, T. 1976. Técnicas de análisis de suelos. Picro Sacro. (Ed.) Santiago de Compostela, España.
- Henseler, M., Wirsig, A., Krimly, T., Dabbert, S. 2008. The influence of climate change, technological progress and political change on agricultural land use: calculated scenarios for the Upper Danube Catchment area. *German J. Agric. Econ.* 57, 207-19 (Agrarwirtschaft).
- Hertig, E., Trambly, Y. 2016. Regional downscaling of Mediterranean droughts under past and future climatic conditions. *Global and Planetary Change* <http://dx.doi.org/10.1016/j.gloplacha.2016.10.015>.
- Hilden, M., Lehtonen, M., Barlund, I., Hakala, K., Kaukoranta, T., Tattari, S. 2005. The practice and process of adaptation in Finnish agriculture. FINADAPT Working Paper 5, vol 335. Helsinki: Finnish Environment Institute Mimeographs, p. 28.
- Hoerling, M., Eischeid, J., Perlwitz, J., Quan, X., Zhang, T., Pegion, P. 2012. On the increased frequency of Mediterranean drought. *Journal of Climate* 25, 2146-2161.
- Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguer, M., van der Linden, P.J., Dai, X., Maskell, K., Johnson, C.A. 2001. Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group 1 to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge.
- Hu, J., Lin, X., Wang, J., Dai, J., Chen, R., Zhang, J., Wong, M.H. 2011. Microbial functional diversity, metabolic quotient, and invertase activity of a sandy loam soil as affected by long-term application of organic amendment and mineral fertilizer. *Journal of Soils and Sediments* 11, 271-280.
- Hueso, S., Brunetti, G., Senesi, N., Farrag, K., Hernández, T., García, C. 2012a. Semiarid soils submitted to severe drought stress: influence on humic acid characteristics in organic-amended soils. *Journal of Soils and Sediments* 12, 503-512.

- Hueso, S., García, C., Hernández, T. 2012b. Severe drought conditions modify the microbial community structure, size and activity in amended and unamended soils. *Soil Biology and Biochemistry* 50, 167-173.
- Hueso, S., Hernández, T., García, C. 2011. Resistance and resilience of the soil microbial biomass to severe drought in semiarid soils: The importance of organic amendments. *Applied Soil Ecology* 50, 27-36.
- Hurrell, J.W., 1995. Decadal trends in the North Atlantic Oscillation: regional temperature and precipitation. *Science* 269, 676-679.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2007. Climate change 2007: impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 976
- IPCC(Intergovernmental Panel on Climate Change). 2013. Fifth Assessment Report: Climate Change 2013 (AR5) Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Joergensen, R.G. 2000. Ergosterol and microbial biomass in the rhizosphere for grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 647-652.
- Jorge-Mardomingo, I., Soler-Rovira, P., Casermiro, M.A., de la Cruz, M.T., Polo, A.2013. Seasonal changes in microbial activity in a semiarid soil after application of a high dose of different organic amendments. *Geoderma* 206, 40-48.
- Kadian, N., Malik, A., Satya, S., Dureja, P. 2012. Effect of organic amendments on microbial activity in chlorpyrifos contaminated soil. *Journal of Environmental Management* 95, S199-S202.
- Kandeler, E., Gerber, H. 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils* 6, 68-72.
- Karlen, D. L., Mausbach, M. J., Doran, J. W., Cline, R. G., Harris, R.F., Schuman, G.E. 1997. Soil quality: a concept, definition and framework for evaluation. *Soil Science Society of America Journal* 61, 4-10.
- Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomo, J.N., Lee, H., Trevors, J.T. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58, 169-188.

- Knicker, H. 2011. Solid state CPMAS ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopy in organic geochemistry and how spin dynamics can either aggravate or improve spectra interpretation. *Organic Geochemistry* 42, 867-890.
- Knicker, H., Lüdemann, H.-D. 1995. N-15 and C-13 CPMAS and solution NMR studies of N-15 enriched plant material during 600 days of microbial degradation. *Organic Geochemistry* 23, 329-341.
- Kohler, J., Caravaca, F., Roldan, A. 2009. Effect of drought on the stability of rhizosphere soil aggregates of *Lactuca sativa* grown in a degraded soil inoculated with PGPR and AM fungi. *Applied Soil Ecology* 42, 160-165.
- Kononova, M.M. 1966. Soil organic matter. Its nature, its role in soil formation and in soil fertility. Oxford: Pergamon; p. 544.
- Ladd, J.N., Butler, J.H. 1975. Humus-enzyme systems and synthetic organic polymer-enzyme analogs. *Soil Biology and Biochemistry* 4, 143-194.
- Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* 123, 1-22.
- Lamersdorf, N.P., Beier, C., Blanck, K., Bredemeier, M., Cummins, T., Farrel, E.P., Kreutzer, K., Rasmussen, L., Ryan, M., Weis, W., Xu, Y.J. 1998. Effect of drought experiments using roof installations on acidification/nitrification of soils. *Forest Ecology and Management* 101, 95-109.
- Larson, W.E., Pierce, F.J. 1991. Conservation and enhancement of soil quality. In Evaluation of sustainable management in the developing world. Vol. 2. IBSRAM Proc. 121 (2). Int. Board for Soil Res. and Management, Bangkok. Thailand, p 175-203.
- Lechavalier, M.P. 1977. Lipids in bacterial taxonomy - a taxonomist's view. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 5, 109-210.
- Leffler, J.W. 1980. Microcosmology: thoretical application of biological models. En "Microcosms in ecological research", Giesey J.P. Jr (Ed), U.S. Department of Energy 1980.
- Lepinas, F., Ludwig, W., Heussner, S. 2014. Hydrological and climatic uncertainties associated with modeling the impact of climate change on water resources of small Mediterranean coastal rivers. *Journal of Hydrology* 511, 403-422.
- Li, L.-J., You, M.-Y., Shi, H.-A., Ding, X.-L., Qiao, Y.-F., Han, X.-Z. 2013. Soil CO₂ emissions from a cultivated Mollisol: effects of organic amendments, soil temperature, and moisture. *European Journal of Soil Biology* 55, 83-90.

- Lionello, P., et al., 2006. The Mediterranean climate: an overview of the main characteristics and issues. In: Lionello, P., Malanotte-Rizzoli, P., Boscolo, R. (Eds.), *Mediterranean Climate Variability*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-26.
- Liu, K. 1994. Preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatographic analysis of lipids in biological materials. *Journal of the American Oil Chemists Society* 71, 1179-1187.
- Luo, Y., Zhou, X. 2006. *Soil Respiration and the Environment*. Academic Press, London, p. 328.
- Luterbacher, J., et al., 2006. Mediterranean climate variability over the last centuries. A review. In: Lionello, P., Malanotte-Rizzoli, P., Boscolo, R. (Eds.), *Mediterranean Climate Variability*. Elsevier, Amsterdam, pp. 27-148.
- Maire, N., Borcard, D., Laczkó, E., Matthey, W. 1999. Organic matter cycling in grassland soils of Swiss Jura mountains: biodiversity and strategies of the living communities. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1281-1293.
- Manzoni, S., Schimel, J.P., Porporato, A. 2012. Responses of soil microbial communities to water stress: results from a meta-analysis. *Ecology* 93, 930-938.
- MAPA. 1994. *Métodos oficiales de análisis*. Vol. 3, Pesca y Alimentación: Ministerio de Agricultura, Madrid, 662 p.
- Maracchi, G., Sirotenko, O., Bindi, M. 2005. Impacts of present and future climate variability on agriculture and forestry in the temperate regions: Europe. In: Salinger, J., Sivakumar, M.V.K., Motha, R.P. (Eds.), *Increasing Climate Variability and Change*. Springer, Amsterdam, pp. 117-135.
- Marschner, P., Kandeler, E., Marschner, B. 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 453-461.
- Menon, P., Gopal, M., Prasad, R. 2004. Influence of two insecticides, chlorpyrifos and quinalphos, on arginine ammonification and mineralizable nitrogen in two tropical soil types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7370-7376.
- Michelle, R., Robert, G., Jo. 1999, H. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends in Biotechnology* 17, 403-409.
- MIDI. 1990. Identification of bacterial by gas chromatography of cellular fatty acids, Technical note 101, MIDI, Newark, USA.

- Mortola, N., Lupi, A.M. 2011. Indicadores de calidad de suelo para el manejo sustentable de los agroecosistemas productivos en Argentina. VI Congreso Iberoamericano de Física y Química Ambiental. México.
- Muhr, J., Franke, J., Borken, W. 2010. Drying-rewetting events reduce C and N losses from a Norway spruce forest floor. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1303-1312.
- Nadal, M., Marquès, M., Mari, M., Domingo, J.L. 2015. Climate change and environmental concentrations of POPs: A review. *Environmental Research* 143, 177-185.
- Nielsen, P., Petersen, S.O. 2000. Ester-linked polar lipid fatty acid profiles of soil microbial communities: a comparison of extraction methods and evaluation of interference from humic acids. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1241-1249.
- Nouri, M., Homaei, M., Bannayan, M., Hoogenboom, G. 2016. Towards modeling soil texture-specific sensitivity of wheat yield and water balance to climatic changes. *Agricultural Water Management* 177, 248-263.
- Noyes, P.D., McElwee, M.K., Miller, H.D., Clark, B.W., Van Tiem, L.A., Walcott, K.C., Erwin, K.N., Levin, E.D. 2009. The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world. *Environment International* 35, 971-986.
- Oburger, E., Jones, D. 2009. Substrate mineralization studies in the laboratory show different microbial C partitioning dynamics than in the field. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1951-1956.
- Olesen, J.E., Bindi, M. 2002. Consequences of climate change for European agricultural productivity, land use and policy. *European Journal of Agronomy* 16, 239-262.
- Olesen, J.E., Carter, T.R., Daaz-Ambrona, C.H., Fronzek, S., Heidmann, T., Hickler, T., Holt, T., Ángeles, M.I., Morales, P., Palutikof, J., Quemada, M., Ruiz-Ramos, M., Rubak, G., Sau, F., Smith, B., Sykes, M. 2007. Uncertainties in projected impacts of climate change on European agriculture and terrestrial ecosystems based on scenarios from regional climate models. *Climatic Change* 81, 123-43.
- Olsson, S., Alström, S., Persson, P. 1999. Barley rhizobacterial population characterized by fatty acid profiling. *Applied Soil Ecology* 12, 197-204.
- Olsson, S., Persson, P. 1999. The composition of bacterial populations in soil fractions differing in their degree of adherence to barley roots. *Applied Soil Ecology* 12, 205-215.

- Øvreås, L., Torsvik, V. 1998. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology* 36, 303-315.
- Panettieri, M. 2013. Secuestro de carbono y mejora de la calidad del suelo bajo laboreo de conservación en condiciones mediterráneas (SO de Andalucía). CSIC-IRNAS (España). Tesis Doctoral, inédita.
- Peersen, O.B., Wu, X., Kustanovich, I., Smith S.O. 1993. Variable-amplitude cross-polarization MAS NMR. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* 104, 334-339.
- Pereira, L.S., Cordery, I., Iacovides, I. 2012. Improved indicators of water use performance and productivity for sustainable water conservation and saving. *Agricultural Water Management* 108, 39-51.
- Perucci, P., Casucci, C., Dumontel, S. 2000. An improved method to evaluate the *o*-diphenol oxidase activity of soil. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1927-1933.
- Polvillo, O. 2003. Análisis geoquímico-orgánico de sedimentos del estuario del Río Guadiana y su relación con la detección de cambios ambientales en el Holoceno. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Sevilla (España). Tesis Doctoral, inédita.
- Preston, C.M. 1996. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Science* 161, 144-166.
- Preston, C.M. 2001. Carbon-¹³ CPMAS NMR of soil organic matter-using the technique effectively. *Canadian Journal of Soil Science* 81, 255-270.
- Rawls, W.J., Pachepsky, Y.A., Ritchie, J.C., Sobecki, T.M., Bloodworth, H. 2003. Effect of soil organic carbon on soil water retention. *Geoderma* 116, 61-76.
- Ritchie, J. D., Perdue, E. M. 2003. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 85-96.
- Rodríguez-Morgado, B., Gómez, I., Parrado, J., Tejada, M. 2014. Behaviour of oxyfluorfen in soils amended with edaphic biostimulants/biofertilizers obtained from sewage sludge and chicken feathers. Effects on soil biological properties. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 11027-11035.
- Ros, M., Hernández, M.T., García, C. 2003. Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 463-469.

- Ruzicka, S., Edgerton, D., Norman, M., Hill, T. 2000. The utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soils. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 989-1005.
- Saadi, S. Todorovic, M., Tanasijevic, L., Pereira, L.S., Pizzigalli, C., Lionello, P. 2015. Climate change and Mediterranean agriculture: Impacts on winter wheat and tomato crop evapotranspiration, irrigation requirements and yield. *Agricultural Water Management* 147, 103-115.
- Sánchez-Canales, M., López Benito, A., Passuello, A., Terrado, M., Ziv, G., Acuña, V., Schuhmacher, M., Elorza, F.J. 2012. Sensitivity analysis of ecosystem service valuation in a Mediterranean watershed. *Science of Total Environment* 440, 140-153.
- Sardans, J. Peñuelas, J., Ogaya, R. 2008. Experimental drought reduced acid and alkaline phosphatase activity and increased organic extractable P in soil in a *Quercus ilex* Mediterranean forest. *European Journal of Soil Biology* 44, 509-520.
- Schimel, J., Balser, T.C., Wallenstein, M. 2007. Microbial stress–response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* 88, 1386-1394.
- Schnitzer, M. 1982. Organic Matter Characterization. En: Page, A. L., Miller, R. H. y Keeney, D. R. (Eds.), *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. Agronomy monograph No. 9. 2nd ed.* ASA/CSSA/SSSA, Madison, WI, pp. 581-594.
- Schutter, M.E., Dick, R.P. 2000. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities. *Soil Science Society of America Journal* 64, 1659-1668.
- Seneviratne, S.I., Corti, T., Davin, E.L., Hirschi, M., Jaeger, E.B., Lehner, I., Orlowsky, B., Teuling, A.J. 2010. Investigating soil moisture–climate interactions in a changing climate: A review. *Earth-Science Reviews* 99, 125-161.
- Sheeba Singh, V.P., Sristava, P.K., Prasad, S.M. 2011. Differential physiological and biochemical responses of two cyanobacteria *Nostocmuscorum* and *Phormidiumfoveolarum* against oxyfluorfen and UV-B radiation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1981-1993.
- Simpson, A.J., McNally, D.J., Simpson, M.J. 2011. NMR spectroscopy in environmental research: From molecular interactions to global processes. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 58, 97-175.

- Sowerby, A., Emmett, B., Beier, C., Tietema, A., Penuelas, J., Estiarte, M., Van Meeteren, M.J.M., Hughes, S., Freeman, C. 2005. Microbial community changes in heathland soil communities along a geographic gradient: interaction with climate change manipulations. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1805-1813.
- Spinoni, J., Naumann, G., Vogt, J., Barbosa, P. 2015. European drought climatologies and trends based on a multi-indicator approach. *Global and Planetary Change* 127, 50-57.
- Soil Survey of England and Wales. 1982. Soil Survey Laboratory methods. Harpenden, UK: Technical Monograph 6. SSEW.
- Steele, H., Wolfgang, S. 2005. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. *FEMS Microbiology Letters* 247, 105-111.
- Tabatabai MA. 1996. Soil organic matter testing: an overview, in: Magdoff RR, Tabatabai MA, Hanlon, Jr EA (eds.). Soil organic matter: analysis and interpretation. SSSA Special Publication Number 46, Soil Science Society of America, Madison, WI. p. 1-9.
- Tabatabai, M. A. 1982. Page, A. L., Miller, R. H. and Keeney, D. R. (eds) Soil Enzymes. En: Methods of Soil Analysis. Chemical and Microbiological Properties Part 2: 903-947 2nd Ed. Agronomy 9, ASA-SSSA. Madison.
- Tabatabai, M. A., Bremner, J. M. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 1, 301-307.
- Tejada, M., Benítez, C. 2011. Organic amendment based on vermicomposts and compost: differences on soil properties and maize yield. *Waste Management Research* 29, 1185-1196.
- Tejada, M., García, C., Hernández, T., Gómez, I. 2015. Response of soil microbial activity and biodiversity in soil polluted with different concentrations of cypermethrin insecticide. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 69, 8-19.
- Tejada, T., García-Martínez, A.M., Rodríguez-Morgado, B., Carballo M., García-Antras, D., Aragón, C., Parrado, J. 2013. Obtaining biostimulant products for land application from the sewage sludge of small populations. *Ecological Engineering* 50, 31-36.
- Tejada, M., Gómez, I., del Toro, M. 2011. Use of organic amendments as a bioremediation strategy to reduce the bioavailability of chlorpyrifos insecticide

- in soils. Effects on soil biology. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 2075-2081.
- Tejada, M., Gómez, I., Franco-Andreu, L., Benítez, C. 2016. Role of different earthworms in a soil polluted with oxyfluorfen herbicide: short-time response on soil biochemical properties. *Ecological Engineering* 86, 39-44.
- Tejada, M., Gómez, I., Hernández, T., García, C. 2010a. Utilization of vermicomposts in soil restoration: effects on soil biological properties. *Soil Science Society of America Journal* 74, 525-532.
- Tejada, M., Gómez, I., Hernández, T., García, C. 2010b. Response of *Eiseniafetida* to the application of different organic wastes in an aluminium-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1944-1949.
- Tejada, M., González, J.L. 2009. Application of two vermicomposts on a rice crop: Effects on soil biological properties and rice quality. *Agronomy Journal* 101, 336-344.
- Tejada, M., González, J.L., García-Martínez, A.M., Parrado, J. 2008a. Effects of different green manures on soil biological properties and maize yield. *Bioresource Technology* 99, 1758-1767.
- Tejada, M., Hernandez, C., M.T., García, C. 2006. Application of two organic amendments on soil restoration: effects on the soil biological properties. *Journal of Environmental Quality* 35, 1010-1017.
- Tejada, M., Masciandaro, G. 2011. Application of organic wastes on a benzo(a)pyrene polluted soil. Response of soil biochemical properties and role of *Eiseniafetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 668-674.
- Tejada, M., Moreno, J.L., Hernandez, M.T., Garcia, C. 2008b. Soil amendments with organic wastes reduce the toxicity of nickel to soil enzyme activities. *European Journal of Soil Biology* 44, 129-140.
- Tejada, M., Morillo, E., Gómez, I., Madrid, F., Undabeytia, T. 2017. Effect of controlled release formulations of diuron and alachlor herbicides on the biochemical activity of agricultural soils. *Journal of Hazardous Materials* 332, 334-347.
- Tejada, M., Rodríguez-Morgado, B., Gómez, I., Parrado, J. 2014. Degradation of chlorpyrifos using different biostimulants/biofertilizers: effects on soil biochemical properties and microbial community. *Applied Soil Ecology* 84, 158-165.

- Torsvik, V., Øvreås, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5, 240-245.
- Torres, I.F., Bastida, F., Hernández, T., García, C. 2015. The effects of fresh and stabilized pruning wastes on the biomass, structure and activity of the soil microbial community in a semiarid climate. *Applied Soil Ecology* 89, 1-5.
- Tramblay, Y., El Adlouni, S., Servat, E. 2013. Trends and variability in extreme precipitation indices over North Africa. *Natural Hazards and Earth System Sciences* 13, 3235-3248.
- Trevors, J. T., Mayfield, C. I., Inniss, W. E. 1982. Measurement of electron transport systems (ETS) activity in soil. *Microbial Ecology* 8, 163-168.
- Trigo, R., et al., 2006. Relations between variability in the Mediterranean region and mid-latitude variability. In: Lionello, P., Malanotte-Rizzoli, P., Boscolo, R. (Eds.), *Mediterranean Climate Variability*. Elsevier, Amsterdam, pp. 179-226.
- Tuck, G., Glendining, J.M., Smith, P., House, J.I., Wattenbach, M. 2006. The potential distribution of bioenergy crops in Europe under present and future climate. *Biomass and Bioenergy* 30, 183-97.
- Tuomisto, H.L., Hodge, I.D., Riordan, P., Macdonald, D.W. 2012. Does organic farming reduce environmental impacts? A meta-analysis of European research. *Journal of Environmental Management* 112, 309-320.
- Uhlířová, E., Elhottová, J., Triska, J., Santrůčková, H. 2005. Physiology and microbial community structure in soil at extreme water content. *Folia Microbiologica* 50, 161-166.
- Ulbrich, U., et al., 2006. The Mediterranean climate change under global warming. In: Lionello, P., Malanotte-Rizzoli, P., Boscolo, R. (Eds.), *Mediterranean Climate Variability*. Elsevier, Amsterdam, pp. 398-415.
- Valverde, P. Carvalho, M., Serralheiro, R., Maia, R., Ramos, V., Oliveira, B. 2015. Climate change impacts on rainfed agriculture in the Guadiana river basin (Portugal). *Agricultural Water Management* 150, 35-45.
- Van Meeteren, M.J.M., Tietema, A., van Loon, E.E., Verstraten, J.M. 2008. Microbial dynamics and litter decomposition under a changed climate in a Dutch heathland. *Applied Soil Ecology* 38, 119-127.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 703-707.

- Vasileva-Tonkova, E., Nustorova, M., Gushterova, A. 2007. New protein hydrolysates from collagen wastes used as peptone for bacterial growth. *Current Microbiology* 54, 54-57.
- Wintzingerode, F., Goëbel, U.B., Stackebrandt, E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21, 213-229.
- Xu, Z.H., Chen, C.R., He, J.Z., Liu, J.X. 2009. Trend and challenges in soil research 2009: linking global climate change to local long-term forest productivity. *Journal of Soils and Sediments* 9, 83-88.
- Yang, F., Zhang, G.-L., Yang, J.-L., Li, D.-C., Zhao, Y.-G., Liu, F., Yang, R.-M., Yang, F. 2014. Organic matter controls of oil water retention in an alpine grassland and its significance for hydrological processes. *Journal of Hydrology* 19, 3086-3093.
- Yeomans, J., Bremner, J. M. 1989. A rapid and precise method four routine determination of organic carbon in soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 19, 1467-1476.
- Young, I., Crawford, J. 2004. Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. *Science* 304, 1634-1637.
- Zabaloy, M.C., Garland, J.L., Gómez, M.A. 2008. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Applied Soil Ecology* 40, 1-12.
- Zelles, L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: A review. *Biology and Fertility of Soils* 29, 111-129.
- Zelles, L., Bai, Q.I., Beck, T., Beese, F. 1992. Signature fatty-acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 317-323.
- Zhong, J., Sleighter, R.L., Salmon, E., McKee, G.A., Hatcher, P.G. 2011. Combining advanced NMR techniques with ultrahigh resolution mass spectrometry: A new strategy for molecular scale characterization of macromolecular components of soil and sedimentary organic matter. *Organic Geochemistry* 42, 903-916.

8. *PUBLICACIONES* *OBTENIDAS*

Los resultados experimentales a los que ha dado lugar esta Tesis Doctoral están recogidos en los siguientes medios de divulgación:

Revistas incluidas en SCI

Se tomó como referencia la última clasificación (2015).

1. Franco-Andreu, L., Gómez, I., Parrado, J., García, C., Hernández, T., Tejada, M. 2016. Behavior of two pesticides in a soil subjected to severe drought. Effects on soil biology. *Applied Soil Ecology* 105, 17-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.001>.

ÍNDICE DE IMPACTO: 2,670

CATEGORÍA: SOIL SCIENCE (8/34)

2. Franco-Andreu, L., Gómez, I., Parrado, J., Knicker, H., Tejada, M. 2017. The effect of severe drought on the evolution of urban and manure-wastes in an agricultural soil in Mediterranean ecosystems. *Land Degradation & Development* 28, 773-782. DOI: 10.1002/ldr.2631.

ÍNDICE DE IMPACTO: 8,145

CATEGORÍA: SOIL SCIENCE (1/34)

ENVIRONMENTAL SCIENCES (6/225)

3. Franco-Andreu, L., Gómez, I., Parrado, J., García, C., Hernández, T., Tejada, M. 2017. Soil biology changes as a consequence of organic amendments subjected to a severe drought. *Land Degradation & Development* DOI: 10.1002/ldr.2663.

ÍNDICE DE IMPACTO: 8,145

CATEGORÍA: SOIL SCIENCE (1/34)

ENVIRONMENTAL SCIENCES (6/225)